Der Vitamin D-Gehalt der Milch und seine Beeinflussung durch Goldhaferfütterung

Anke Fischer-Brandies

Diss. München
1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534917_0017

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

DER VITAMIN D - GEHALT DER MILCH UND SEINE BEEINFLUSSUNG DURCH GOLDHAFERFÜTTERUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anke Fischer-Brandies
aus
Hiltrup

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. H. Zucker
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. G. Dirksen

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Inhaltsübersicht

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	Vitamin D in der Milch	3
2.1.1.	Antirachitische Aktivität der Milch	3
2.1.1.1.	Aktivität nach älteren und neueren Untersuchungen	4
2.1.1.2	Einfluß der Fütterung	9
2.1.1.3	Einfluß der Jahreszeit	10
2.1.1.4	Supplementierung mit Vitamin D	12
2.1.2.	Vitamin D-Metaboliten im Serum und in der Milch	15
2.1.3.	Vitamin D-Sulfat	19
2.2.	Methoden zur Bestimmung von Vitamin D in der Milch	21
2.3.	Goldhafer als mögliche Vitamin D_3-Quelle	29
3.	PROBLEMSTELLUNG	31
4.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	32
4.1.	Tiermaterial, Haltung und Fütterung	32
4.2.	Probengewinnung	32
4.3.	Methode	35
4.3.1.	Vitamin D_3-Bestimmung in der Milch	35
4.3.2.	$25(OH)D_3$- und $1,25(OH)_2D_3$-Bestimmung im Serum	42
4.4.1.	Ergebnisse der Vitamin D_3-Bestimmung in der Milch	43
4.4.2	Futteraufnahme	48
4.4.3	Ergebnisse der Calcium- und Phosphatbestimmung im Serum	49
4.4.4	Ergebnisse der Serum-25(OH)D- und $1,25(OH)_2D$-Bestimmung	49
4.5.	Diskussion	53
5.	ZUSAMMENFASSUNG	58
6.	SUMMARY	60
7.	LITERATURVERZEICHNIS	62

1. EINLEITUNG

Die enzootische Kalzinose des Voralpengebietes ist eine Erkrankung von Weidetieren, deren klinisches und pathologisch-anatomisches Bild weitgehend einer D-Hypervitaminose gleicht. Die betroffenen Tiere zeigen Störungen des Allgemeinbefindens, des Bewegungsapparates und der Herz- und Atemtätigkeit. Die Calcium-Serumkonzentration liegt an der oberen physiologischen Grenze, während der Gehalt des anorganischen Phosphors stark erhöht ist. Bei der Sektion finden sich ausgedehnte Verkalkungen der Weichgewebe, vor allem des Endokards, der großen Arterien, der Lunge und der Beugesehnen.

Als Ursache dieser Erkrankung wurde die Aufnahme des Weidegrases Goldhafer (Trisetum flavescens) erkannt (DIRKSEN et al. 1972).

RAMBECK et al. (1979) konnten nachweisen, daß im Ätherextrakt des Goldhafers Vitamin D_3 vorliegt, das bislang als rein "tierisches" Vitamin angesehen wurde, während Vitamin D_2 als "pflanzliches" Vitamin galt.

Da Goldhafer auf Weiden des Voralpengebietes, die über 500 m hoch liegen, nicht selten auftritt, stellt sich die Frage, ob die erhöhte Vitamin D_3-Aufnahme durch Rinder auf diesen Weiden auch zu einer Erhöhung des Vitamin D_3-Gehaltes der Milch führt.

Die Höhe des natürlichen Vitamin D-Gehaltes der Milch nach der Entdeckung von Vitamin-D-Sulfat in der Milch durch SAHASHI et al. (1967) war Gegenstand mehrerer Untersuchungen, die zu sehr unter-

schiedlichen Ergebnissen führten.

Vor der Beschreibung eigener Untersuchungen zum Vitamin D-Gehalt von Kuhmilch nach Goldhaferfütterung soll daher zunächst ein Überblick über die Literatur zum Vitamin D-Gehalt der Milch und seiner Bestimmung gegeben werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Vitamin D in der Milch

2.1.1. Antirachitische Aktivität der Milch

Milch stellt unter natürlichen Lebensbedingungen die Hauptnahrungsquelle tierischer und menschlicher Säuglinge dar. Ihre Zusammensetzung bezüglich Protein, Fett, Lactose, Mineral- und Wirkstoffen ist in hohem Maße an die unterschiedlichen Bedürfnisse verschiedener Tierarten angepaßt. Dennoch können bei ausschließlicher Milchernährung Mangelerscheinungen im Säuglingsalter auftreten. Angesichts der Kinder- und Jungtierkrankheit Rachitis stellt sich die Frage nach dem Vitamin D-Gehalt der Milch, denn die klassische Form dieser Erkrankung wird durch eine Hypovitaminose D hervorgerufen.

Vitamin D zählt zu den fettlöslichen Vitaminen; seine Struktur ist eine Abwandlung des Steroidgerüstes, wobei Ring B des steroidalen Vierringsystems aufgespalten ist.

Unter den Vitaminen nimmt es insofern eine Sonderstellung ein, als neben der Aufnahme über das Futter eine Eigensynthese in der Haut nach UV-Bestrahlung stattfindet. Dabei entsteht aus dem in der Haut gelagerten Provitamin, dem 7-Dehydrocholesterin, das eigentliche Vitamin D. Dieses sogenannte "tierische Vitamin D" wird als Vitamin D_3 oder auch Cholecalciferol bezeichnet.
Das sogenannte "pflanzliche" Vitamin D_2 oder Ergocalciferol entsteht in analoger Weise nach UV-Bestrahlung des Provitamins Ergosterin in vielen Pflanzenarten.

Die hauptsächlich wirksamen Formen von Cholecalciferol und Ergocalciferol werden erst nach Hydroxylierung in der Leber zu 25-OH-Vitamin D (25-OH-D) und nachfolgend in der Niere zu $1,25(OH)_2$-Vitamin D ($1,25(OH)_2D$) gebildet. Mit den beiden Hydroxylierungsschritten ist jeweils eine Steigerung der Wirksamkeit verbunden. In seiner Wirkungsweise entspricht $1,25(OH)_2$-Vitamin D einem Steroidhormon, sodaß die D-Vitamine weniger als Vitamine als vielmehr als essentielle Vorstufe für die Synthese des Steroidhormones $1,25(OH)_2$-Vitamin D anzusehen sind.

$1,25(OH)_2$-D spielt eine Rolle bei der Resorption von Calcium- und Phosphat-Ionen aus dem Dünndarm, sowie zusammen mit Parathormon in der Calcium- und Phosphat-Mobilisierung aus dem Knochen und der Rückresorption von Calcium in der Niere. Es ist so an der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase beteiligt und führt zu einer Verbesserung der Calcium-Bilanz.

2.1.1.1. Antirachitische Aktivität der Milch nach älteren und neueren Untersuchungen

Die meisten Lebens- und Futtermittel, mit Ausnahme von Fischleberöl und Fischprodukten, weisen einen sehr geringen Gehalt an Vitamin D auf. Einige Beispiele sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Literaturangaben zum Vitamin D-Gehalt von Kuh- und Muttermilch zeigen teilweise erhebliche Unterschiede. Dieses ist vor allem auf die verwendeten Bestimmungsmethoden zurückzuführen (siehe Abschnitt 2.2.).

Tabelle 1: Vitamin D-Gehalt einiger Lebens- und Futtermittel

Thunfischleberöl	45.000	IE/ml[+]
Hering (Ganzkörperdurchschnitt)	3 - 13	IE/g
Kalbfleisch	0	
Gras	0,03 - 1,8	IE/g
Heu (sonnengetrocknet)	0,05 - 1	IE/g

aus: Ammon, Dirscherl (1974)

Prinzipiell müssen biologische Tests und chemisch-physikalische Analysen unterschieden werden. Während im biologischen Test die Bestimmung der Vitamin-D-artigen Gesamtaktivität erfolgt, ist es mit verschiedenen chemischen Verfahren möglich, zwischen Vitamin D und seinen Metaboliten zu differenzieren. Je nach Vorkommen der Metaboliten kann man daher mit biologischen und chemisch-analytischen Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen gelangen. Dieses ist insbesondere der Fall, wenn nicht alle zur Aktivität beitragenden Abkömmlinge von Vitamin D bei der Analyse erfaßt werden. Zudem ist mit chemischen Analysen allein nicht die tatsächliche biologische Aktivität nachgewiesen.

Von Bedeutung ist auch, welche Fraktion der Milch zur Bestimmung herangezogen wird. Während SAHASHI et al. (1967), LE BOULCH et al. (1974), LAKDAWALA et al. (1977) u.a. eine hohe Aktivität im Wasserlöslichen finden und diese dem Vitamin-D-Sulfat zuordnen, das sich jedoch später als inaktiv erwies, erklären HOLLIS et al. (1981) diese Erscheinung mit

---

[+] 1 Internationale Einheit (IE) = 0,025 µg Vit. D_2 bzw. Vit. D_3

einer reversiblen Bindung von Vitamin D und seinen Metaboliten an Proteine, mit Dissoziation kurz nach der Sezernierung.

Nachfolgend sind die Ergebnisse einiger Untersuchungen zum Vitamin D-Gehalt von Kuh- und Muttermilch tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2: Vitamin D in Kuh- und Muttermilch nach biologischer Bestimmung

Autor und Jahr	Milchart	Vit.-D-artige Aktivität (pro Liter Milch)
Karg (1953)	Kuhmilch	20 - 110 IE
Lenkeit et al. (1958, 1959)	Kuhmilch	3 - 24 IE
Leerbeck et al.(1980)	Kuhmilch	38 IE
Reeve et al. (1982)	Kuhmilch	40 IE
Leerbeck et al.(1980)	Muttermilch	15 IE

Tabelle 3: Vitamin D in Kuhmilch nach analytischer Bestimmung

Autor und Jahr	Vitamin D (pro Liter Milch)	Vitamin D-Derivate (pro Liter Milch)
Sahashi et al. (1967)	0,9 µg = 36 IE	Vit. D Sulfat : 5 µg
Le Boulch et al. (1974)	1,4 µg = 56 IE	25-OH-D_3 : 0,25 µg Vit. D Sulfat : 4,4 µg
Adachi et al. (1979)	0,5-2,0 µg = 19-79 IE	
Hollis et al. (1981)	0,043 µg = 1,7 IE	25-OH-D_3 : 0,372 µg 24,25$(OH)_2D_3$: 0,045 µg 25,26$(OH)_2D_3$: 0,021 µg 1,25$(OH)_2D_3$: 0,005 µg
Hollis et al. (1982)	0,025-0,1 µg = 1,4 IE	25-OH-D_3 : 0,1-0,3 µg 1,25$(OH)_2D_3$: 0,001-0,003 µg
Reeve et al. (1982)	0,281 µg = 11 IE	25-OH-D_3 : 0,145 µg 24,25$(OH)_2D_3$: 0,027 µg 1,25$(OH)_2D_3$: 0,005 µg

Tabelle 4: Vitamin D in Muttermilch nach analytischer Bestimmung

Autor und Jahr	Vitamin D (pro Liter Milch)	Vitamin D-Derivate (pro Liter Milch)
Sahashi et al. (1967)	0,4 µg = 16 IE	Vit. D Sulfat : 24 µg
Le Boulch et al. (1974)	1,5 µg = 60 IE	25-OH-D : 0,15 µg Vit. D Sulfat : 10 µg
Lakdawala et al. (1977)		Vit. D Sulfat : 10-17,8 µg
Hollis et al. (1981)	0,039 µg = 1,6 IE	25-OH-D : 0,311 µg $24,25(OH)_2D_3$: 0,052 µg $25,26(OH)_2D_3$: 0,032 µg $1,25(OH)_2D_3$: 0,005 µg

2.1.1.2. Einfluß der Fütterung

LENKEIT et al. (1958, 1959, 1960) stellten in vergleichenden Untersuchungen mit Ratten und Küken fest, daß die antirachitische Aktivität von Kuhmilch fast vollständig auf dem Cholecalciferol- und nicht dem Ergocalciferolgehalt beruht. Sie schlossen daraus, daß das Vitamin D der Milch der endogenen Synthese entstammt und daß die Ergocalciferolaufnahme über Heu und andere pflanzliche Futtermittel ohne Einfluß auf die Milch bleibt. Auch durch Zufütterung von 8.000 IE Vitamin D_3 pro Tier und Tag konnten sie keine Erhöhung der antirachitischen Aktivität erreichen.

HOLLIS et al. (1981) berechneten nach chemischen Analysen, daß bei Zufütterung von 4.000 IE Vitamin D_3 pro Tier und Tag die Gesamtaktivität bei 27 IE/l Kuhmilch lag. Bei einer Supplementierung mit 40.000 IE pro Tier und Tag wurde eine Steigerung auf 55 IE/l Milch errechnet. Der Vitamin D-Gehalt der Milch stieg dabei von 43 ng/l auf 322 ng/l, 25-OH-D von 372 ng/l auf 685 ng/l.

Bei einer Aufnahme von 15.000 IE Vitamin D_3 je Tier und Tag stellten REEVE et al. (1982) eine Gesamtaktivität der Kuhmilch von 40 IE/l mittels Bioassay fest, gegenüber 80 IE/l bei Aufnahme von 215.000 IE.

Die 25-OH-D_3-Serumkonzentration gilt als zuverlässigster Maßstab für die Beurteilung des jeweiligen Vitamin D-Status und wird daher relativ häufig bestimmt. Eine Erhöhung der 25-OH-D_3-Serumkonzentration von Rindern nach oraler Vitamin D_3-Aufnahme wurde von HIDIROGLOU et al. (1979) beobachtet. Bei einmaliger oraler Gabe von 1 Million IE Vitamin D_3 an im Stall

gehaltene Jungrinder war eine Erhöhung des 25-OH-D_3-Serumgehaltes auf 22 ng/ml festzustellen, gegenüber 14 ng/ml bei Kontrolltieren mit Grassilage-Fütterung. Bei freier Aufnahme eines Mineralfutters, das 32.000 IE Vitamin D_3 je kg enthielt, wurden mittlere 25-OH-D_3-Serumwerte von 23 ng/ml ermittelt.

OLSON et al. (1983) fanden bei Milchkuhherden, die über ein Jahr lang täglich 50.000 - 1,2 Millionen IE Vitamin D_3/Tier oral erhalten hatten, Reproduktionsstörungen, Lahmheiten und plötzliche ungeklärte Todesfälle. Die Serum-25-OH-D_3-Konzentration lag bei Tieren, welche täglich 1,2 Millionen IE Vitamin D_3 aufgenommen hatten, um 298 ng/ml, bei Aufnahme zwischen 50.000 und 250.000 IE Vitamin D_3 um 31 - 175 ng/ml. Kontrollgruppen bei 6.000 IE Vitamin D_3 je Tier und Tag wiesen Serumwerte für 25-OH-D um 37 ng/ml auf.

Es scheint also, daß bei Rindern auf oralem Wege über eine einmalige massive Dosis oder kontinuierliche Vitamin D_3-Aufnahme eine Erhöhung der 25-OH-D_3-Serumkonzentration erreichbar ist. Nach HOLLIS et al. (1981) beträgt die Milchkonzentration an Vitamin D_3 und 25-OH-D_3 jedoch nur 1,5 - 3 % der Plasmakonzentration, bzw. 6 % bei $1,25(OH)_2D_3$, sodaß sich Veränderungen des Gehaltes an Vitamin D und seinen Metaboliten im Serum in weit geringerem Maße auf den Gehalt der Milch auswirken.

2.1.1.3 Einfluß der Jahreszeit

Bezüglich Angaben zur saisonalen Abhängigkeit des Vitamin D-Gehaltes der Milch ist man auf ältere Literaturangaben angewiesen.

KARG (1953) stellte fest, daß die antirachitische Aktivität von Butterfett im Sommer bei Weidehaltung auf das Doppelte der für den Winter bei Stallhaltung ermittelten Werte anstieg. Eine weitere Erhöhung fand er im Hochsommer bei Almkühen als Ausdruck der intensiven UV-Bestrahlung in Höhenlagen.

LENKEIT et al. (1958) verfütterten das Unverseifbare der Kuhmilch im prophylaktischen Rattentest. Die Kühe waren im Winter im Stall und im Sommer auf der Weide gehalten worden. Die antirachitische Wirksamkeit der Milch stieg im Sommer bis auf das Vierfache an. Das Maximum wurde Ende Juli erreicht; der Tiefstwert lag im Mai vor dem Weideaustrieb. Milch von Kontrollkühen bei ganzjähriger Stallhaltung zeigte zwar auch eine Erhöhung im Sommer, doch blieben die Konzentrationen deutlich unter den bei Weidetieren ermittelten Werten.

Dieselbe Autorengruppe (1959) untersuchte Sammelmilch, die je zur Hälfte aus Betrieben mit Sommerweidehaltung bzw. ganzjähriger Stallhaltung stammte. Sie fanden ein Jahresminimum von 2,8 IE Vitamin D/kg Milch im Mai, gefolgt vom Anstieg auf ein Maximum von 12,5 IE/kg im September. Ab Ende Oktober bis Mai war ein kontinuierlicher Abfall zu beobachten.

Über die Serum-25-OH-D-Konzentration liegen hingegen neuere Arbeiten vor. Die Angaben in der Literatur stimmen dabei überein, daß je nach Sonnenexposition saisonale Schwankungen beim Menschen und verschiedenen Tierarten festzustellen sind (SALVOLAINEN et al. 1981, HOLMBERG und LARSSON 1981). Jahresmaximalwerte werden dabei im August gemessen, während der Tiefpunkt im Frühling erreicht wird.

HIDIROGLOU et al. (1979) untersuchten die saisonale Beeinflussung des 25-OH-D-Serumgehaltes von Jungrindern. Bei ganzjährig im Stall gehaltenen Tieren lag die mittlere Serum-25-OH-D-Konzentration bei 19 ng/ml im Winter, die sich im Sommer auf 21 ng/ml erhöhte. Rinder, die während des gleichen Zeitraumes ausschließlich im Freien gehalten wurden, wiesen im Winter die gleiche 25-OH-D-Serumkonzentration auf wie die Vergleichsgruppe im Stall. Im Sommer lag ihr mittlerer Serum-25-OH-D-Gehalt jedoch bei 49 ng/ml.

Bezüglich des Zusammenhanges zwischen Serum-25-OH-D-Konzentration und Vitamin D-Gehalt der Milch wird auf das bereits beim Einfluß der Fütterung Gesagte verwiesen.

2.1.1.4. Supplementierung mit Vitamin D

In einigen Ländern ist es üblich, zum Teil sogar gesetzlich vorgeschrieben, kommerziell gehandelter Milch eine bestimmte Menge Vitamin D zuzusetzen. Dieses Vorgehen wird damit begründet, daß die empfohlene Vitamin-D-Aufnahme, die sog. "recommended daily allowance" von 400 IE/Tag bei üblicher Ernährung nicht immer erreicht wird. So liegt die durchschnittliche Vitamin D-Aufnahme pro Person und Tag nach EGE (1970) in Dänemark bei 158 IE, nach COCKBURN et al. (1980) in Schottland bei 90 IE und nach MacLENNAN (1980) in England bei 104 IE.

In ihrer Eigenschaft als Grundnahrungsmittel und als Trägersubstanz, aus der Vitamin D sehr gut resorbiert wird, ist Milch nach Supplementierung prinzipiell als Vitamin D-Quelle geeignet. Es stellt sich jedoch die Frage nach der Notwendigkeit oder sogar Schädlichkeit

einer ständigen zusätzlichen Vitamin D-Zufuhr.

Es ist schwierig, den tatsächlichen nutritiven Bedarf eines Individuums an Vitamin D abzuschätzen, da viele Faktoren zu berücksichtigen sind. So spielen die Calcium- und Phosphorversorgung und ihr Verhältnis in der Nahrung zueinander eine Rolle. Auch die Eiweiß-, Fett-, Zitronensäure- und Vitamin A-Aufnahme sind von Bedeutung. Den größten Einfluß hat jedoch die endogene Vitaminsynthese, denn diese kann bei ausreichender UV-Bestrahlung den Bedarf bei weitem decken. Bei durchschnittlicher Ernährung mit geringer Vitamin D-Aufnahme kommt der Eigensynthese eine hohe Bedeutung zu. Sie wird von der Pigmentierung der Haut, Kleidung bzw. Behaarung, der geographischen Lage, Jahreszeit, Wetter und Lebens- bzw. Haltungsweise beeinflußt.

Normale Vitamin D-Utilisation und durchschnittliche Sonnenexposition führen im allgemeinen zu einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung. Bei erhöhtem Bedarf wie Wachstum, Gravidität und Laktation wird jedoch häufig eine Vitamin D-Supplementierung empfohlen.

Nach COCKBURN et al. (1980) vermindert die tägliche Supplementierung mit 400 IE Vitamin D_3 bei schwangeren Frauen die Häufigkeit des Auftretens von neonataler Hypocalcämie, tetanischen Konvulsionen und Zahnschmelzdefekten bei den Kindern. MACLENNAN et al. (1980) hingegen vertreten die Ansicht, daß Vitamin D-Supplementierung in der Schwangerschaft nur bei geringer Sonnenexposition nötig ist.

Muttermilch besitzt eine antirachitische Wirksamkeit von etwa 15 IE (LEERBECK und SONDERGAARD, 1980) bis 25 IE (HOLLIS et al.,1981) pro Liter. Im allgemeinen

wird empfohlen, Säuglingen, die ausschließlich mit Muttermilch ernährt werden, täglich etwa 400 IE Vitamin D zusätzlich zu verabreichen. Die in der BRD handelsüblichen Milchpulver für Säuglinge weisen einen Vitamin D-Zusatz von etwa 250 - 350 IE je 100 g auf, wobei eine tägliche Aufnahme von etwa 75 - 150 g in den ersten Lebensmonaten empfohlen wird.

Nach dem Erscheinen der Arbeiten von SAHASHI et al. (1967) und anderer, die vom Auftreten relativ hoher Mengen an Vitamin D-Sulfat in der Muttermilch berichten, wurde von einigen Autoren (u.a. BIRCKBECK et al., 1980) die Meinung geäußert, die bis dahin übliche Supplementierung bei Säuglingen stillender Mütter müsse gründlich überdacht werden, zumal Rachitis auch ohne Supplementierung selten auftrete. Vitamin D-Sulfat scheint jedoch in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vorzukommen, als von diesen Autoren angenommen und zudem nur wenig aktiv zu sein (HOLLIS et al., 1981; REEVE et al., 1981). Nach HOLLIS et al. (1982) ist das seltene Auftreten von Rachitis bei nur mit Muttermilch ernährten Säuglingen eventuell durch eine bessere Utilisation von 25-OH-D, das für einen Großteil der antirachitischen Aktivität der Milch verantwortlich ist, zu erklären.

Es ist jedoch davon auszugehen, daß der fast vollständige Rückgang der Rachitis im Laufe dieses Jahrhunderts durch die routinemäßige Verabreichung von Vitamin D an Säuglinge und Kleinkinder bedingt ist.

2.1.2. Vitamin D-Metaboliten im Serum und in der Milch

Nachdem Ende der Sechziger-Jahre nachgewiesen wurde, daß Vitamin D seine biologische Wirksamkeit erst nach weiterer Metabolisierung entfaltet, setzten umfangreiche Untersuchungen auf diesem Gebiet ein. Zusammenfassende Übersichtsarbeiten liegen unter anderem von DELUCA (1981) und NORMAN et al. (1982) vor.

Cholecalciferol und Ergocalciferol werden im endoplasmatischen Retikulum von Leberzellen enzymatisch zu 25-OH-Vitamin D hydroxyliert. Dieses Produkt stellt mengenmäßig den Hauptanteil der Vitamin D-Metaboliten im Serum. In Nierenmitochondrien erfolgt eine weitere Hydroxylierung. Es entsteht $1,25(OH)_2$-Vitamin D, das bereits in geringen Konzentrationen hochwirksam ist und der klassischen Definition eines Steroidhormons entspricht. Seine Bildung unterliegt einem komplexen Steuerungssystem, das für die Regulierung des Calcium- und Phosphathaushaltes verantwortlich ist. Beteiligte Regulatoren sind Serumcalcium, Serumphosphat, Parathormon, Calcitonin, Sexual- und Wachstumshormone.

$1,25(OH)_2D$ entfaltet seine Wirkung in Darm, Knochen, Niere und anderen Organen. In den Kernen von Dünndarmmukosazellen induziert es die Synthese eines calciumbindenden Proteins (CaBP), das am aktiven Transport der Calciumionen vom Darmlumen in die Mukosazellen beteiligt ist. Auch fördert $1,25(OH)_2D$ die Resorption von Phosphat im Dünndarm. Seine Wirkung im Knochen besteht in der Mobilisierung von Calcium und Phosphat, in der Niere wird die Rückresorption von Calcium gesteigert.

Weitere im Serum auftretende Metaboliten sind $25,26(OH)_2D$ und $24,25(OH)_2D$. $24,25(OH)_2D$ entsteht wie $1,25(OH)_2D$ nach Hydroxylierung von 25-OH-D. Da es vermehrt bei hohen Spiegeln an $1,25(OH)_2D$ gebildet wird, stellt die Produktion von $24,25(OH)_2D$ anscheinend eine Art Schutzmechanismus gegen eine Überschwemmung mit $1,25(OH)_2D$ dar.

Die genannten Funktionen und Hydroxylierungsschritte gelten beim Säugetier für Vitamin D_2 und Vitamin D_3 gleichermaßen.

Den Gehalt der Milch an 25-OH-D_3 untersuchten LE BOULCH et al. (1974). Sie ermittelten dabei Werte von 0,15 µg/l in Muttermilch und 0,25 µg/l in Kuhmilch.

HOLLIS et al. (1981), HOLLIS et al. (1982) und REEVE et al. (1982) bestimmten den Gehalt von Mutter- und Kuhmilch an Vitamin D und seinen Metaboliten. Die Ergebnisse sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

Den obengenannten Untersuchungen zufolge sind hauptsächlich Vitamin D_3 und 25-OH-D_3 für die biologische Aktivität von Kuh- und Muttermilch verantwortlich, während die übrigen Metaboliten in weit geringerer Konzentration vorliegen.

In der Blutbahn liegen Vitamin D und seine Metaboliten zur Hauptsache an ein Transportprotein gebunden vor. DUELAND et al. (1981) fanden in Versuchen mit Ratten, daß Vitamin D_3 bei Resorption aus dem Dünndarm zunächst größtenteils zusammen mit den Chylomikronen in der Lymphe vorliegt. Nach Erreichen der Blutgefäßbahn erfolgt die Bindung an ein spezifisches Transportprotein des Serums, das "vitamin D binding

protein" (DBP). Noch vor Bekanntwerden seiner Funktion war es Genetikern als sog. "group specific component" bekannt, das zu Vaterschaftsnachweisen herangezogen wurde.

Das DBP im Serum des Rindes ist ein α-Globulin mit einem Molekulargewicht von 70.000 und einem Sedimentationskoeffizienten von 4 S. Seine Affinität zu 25-OH-D und 24,25$(OH)_2$D ist bedeutend höher als zu Vitamin D oder 1,25$(OH)_2$D (HOLLIS et al., 1977).

Das DBP des Menschen weist ähnliche Eigenschaften auf (HADDAD and WALGATE, 1976; BOUILLON et al., 1978).

Die Vitamin-D-bindenden Proteine der Milch verschiedener Spezies wurden von HOLLIS und DRAPER (1979) untersucht. Bezüglich ihrer Bindungspräferenz für 25-OH-D und 24,25$(OH)_2$D entsprechen sie dem DBP im Plasma. Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten ergab hingegen, daß in der Milch des Menschen neben einem 4 S - DBP auch ein 6 S - DBP vorliegt, während in der Kuhmilch nur ein 6 S - DBP vorkommt. Im Plasma beider Spezies hingegen ist nur ein 4 S - DBP vorhanden.

Während anzunehmen ist, daß das 4 S - DBP mit demjenigen des Plasmas identisch ist, bestehen noch Unklarheiten über die Herkunft des 6 S - DBP der Milch. Es liegen Hinweise vor, daß es sich bei diesem um die Assoziation des 4 S - Plasma - DBP mit einem Cytosolfaktor des Mammagewebes handelt (HOLLIS et al., 1982).

Während das 4 S - und 6 S - DBP eine Bindungspräferenz für 25-OH-D besitzen, fanden REINHARDT und

CONRAD (1980) im Milchdrüsengewebe von Kühen zusätzlich ein 3,5 S - Protein, das spezifisch und mit hoher Affinität $1,25(OH)_2D_3$ bindet.

Nach den Untersuchungen von HOLLIS et al. (1981 und 1982) sind Vitamin D, 25-OH-D, $24,25(OH)_2D$ und $25,26(OH)_2D$ in der Milch in Konzentrationen von 1,5 - 3 % des Plasmagehaltes vorhanden. Dieses entspricht der Plasma/Milchrelation des DBP. HOLLIS et al. (1981 und 1982) schließen daraus, daß Vitamin D_3 und seine Metaboliten wahrscheinlich an das DBP gebunden in die Milch sezerniert werden. Hingegen beträgt die $1,25(OH)_2D$-Konzentration in der Milch etwa 6 % des Plasmawertes. HOLLIS et al. (1982) vermuten, daß dieses mit den zwei möglichen Rezeptoren für $1,25(OH)_2D$ zusammenhängt. Danach würde $1,25(OH)_2D$ einmal mit dem DBP des Plasmas in die Milch sezerniert, zum anderen auch an das spezifische $1,25(OH)_2D_3$-bindende Protein des Milchdrüsengewebes gebunden.

Wenn Vitamin D und seine Metaboliten in transportproteingebundener Form in das Milchdrüsengewebe gelangen, ist zu erwarten, daß die antirachitische Aktivität im Wasserlöslichen auftritt. Nach HOLLIS et al. (1982) ist dieses bei frisch sezernierter Milch der Fall. Mit der Zeit verlagern sich jedoch Vitamin D und seine Metaboliten in die Lipidfraktion, indem eine Dissoziation vom DBP erfolgt. Die unterschiedlichen Angaben verschiedener Untersucher zum Vitamin D-Gehalt der Milch sind wohl teilweise durch diesen Umstand bedingt.

2.1.3. Vitamin D_3-Sulfat

Während in vielen Untersuchungen nur die Lipidfraktion der Milch auf das - fettlösliche - Vitamin D_3 untersucht worden war, berichteten SAHASHI et al. (1967) vom Auftreten beträchtlicher Mengen einer Vitamin-D-Sulfat-Verbindung im wasserlöslichen Teil von Kuh- und Muttermilch. Die Identifizierung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie, Spektrophotometrie und Antimontrichlorid-Reaktion. In der Annahme, daß Vitamin D-Sulfat die gleiche Aktivität besitzt wie Vitamin D, gaben SAHASHI et al. (1967) den Vitamin D-Sulfat-Gehalt der Kuhmilch mit 204 IE/l an, bei einer Gesamtmenge an Vitamin D von 240 IE/l. Bei Muttermilch lag der chemisch determinierte Vitamin D-Sulfatgehalt bei 950 IE/l, der Gesamt-Vitamin-D-Gehalt bei 956 IE/l.

1969 untersuchten SAHASHI et al. die biologische Aktivität des Vitamin D-Sulfates in der Muttermilch. In prophylaktischen und kurativen Rattentests zeigte synthetisches Vitamin D_2-Sulfat fast die gleiche Aktivität wie Vitamin D_2.

LE BOULCH et al. (1974) ermittelten 10 µg Vitamin D-Sulfat pro Liter Muttermilch und 4,4 µg pro Liter Kuhmilch. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten LAKDAWALA und WIDDOWSON (1977), die je nach Laktationsstadium zwischen 10 und 17,8 µg Vitamin D-Sulfat pro Liter Muttermilch mittels Antimontrichloridreaktion fanden.

LE BOULCH et al. (1982) konnten auch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und UV-Spektrumanalyse Vitamin D_3-Sulfat in Muttermilch feststellen.

Danach sah es so aus, als stelle Vitamin D-Sulfat einen wesentlichen Bestandteil der Vitamin D-Aktivität dar. Als wasserlösliche Substanz wäre es der Bestimmung in zuvor durchgeführten Untersuchungen entgangen, die sich häufig auf die Lipidfraktion der Milch beschränkt hatten.

LEERBECK und SONDERGAARD (1980) wiesen jedoch im kurativen antirachitischen Rattentest eine Gesamtaktivität von nur 38 IE/l Kuhmilch und 15 IE/l Muttermilch nach. Der weitaus größte Anteil der Aktivität fand sich in der Lipidfraktion.

REEVE et al. (1981) stellten fest, daß ß-Cholecalciferol-Sulfat, das von ihnen synthetisiert wurde, nur geringe biologische Aktivität besitzt. Es zeigt weniger als 5 % der Wirkung von Cholecalciferol, Calcium aus dem Knochen zu mobilisieren und nur 1 % von dessen Aktivität in Bezug auf den intestinalen Calciumtransport, Serumphosphaterhöhung und Knochenkalzifizierung. Auch erwies sich Vitamin D_3-Sulfat als relativ stabil, so daß in vivo wenig Cholecalciferol freigesetzt wird.

HOLLIS et al. (1981) konnten mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie keinen Vitamin D-Sulfatgehalt in der Milch nachweisen, der über der Nachweisgrenze von 1 µg/l lag.

Die Frage nach dem Auftreten und der biologischen Aktivität von Vitamin D_3-Sulfat in Kuh- und Muttermilch wird also von verschiedenen Untersuchern unterschiedlich beantwortet. Biologische Tests - mit Ausnahme der Arbeit von SAHASHI et al. (1969) - vermochten die angeblich durch Vitamin D-Sulfat zustandekommende hohe Aktivität nicht zu bestätigen.

2.2. Methoden zur Bestimmung von Vitamin D in der Milch

2.2.1 Biologische Methoden

Biologische Bestimmungsmethoden besitzen den Vorteil einer hohen Empfindlichkeit sowie des Nachweises der tatsächlichen biologischen Wirksamkeit der getesteten Substanz. Demgegenüber stehen als Nachteile ein meist erheblicher Zeitaufwand und die zur Quantifizierung benötigte hohe Anzahl von Versuchstieren.

Zur Bestimmung werden hauptsächlich die folgenden biologischen Wirkungen herangezogen (NORMAN, 1979):

- Wirkung von Vitamin D auf die Knochenmineralisation bei Jungtieren (Ratten Line Test, prophylaktischer und kurativer Röntgentest, Knochenaschetest)
- Stimulierung des Wachstums
- Einfluß von Vitamin D auf die Eischalenbildung (Wachteleischalentest)
- Stimulierung der intestinalen Calciumabsorption
- Mobilisierung des Knochencalciums
- Bildung des Calcium bindenden Proteins (CaBP)

2.2.2. Chemisch-physikalische Methoden

Die Schwierigkeit der Vitamin D-Bestimmung in der Milch mittels analytischer Methoden besteht darin, daß bei einem sehr geringen Gehalt an Vitamin D eine Vielzahl ebenfalls fettlöslicher Substanzen wie ver-

schiedene Lipide, Vitamin A, Vitamin E und Sterine vorhanden ist, deren Konzentration erheblich höher liegt. Dabei ist es erforderlich, Vitamin D_3 im Bereich von etwa 0,04 - 0,3 µg/l Milch quantitativ zu erfassen. Einige der entwickelten analytischen Bestimmungsmethoden sind nicht ausreichend empfindlich oder spezifisch und eignen sich deshalb nur für Milch mit Vitamin D-Zusätzen.

Zur Abtrennung des Vitamin D von den übrigen Bestandteilen der Lipidfraktion der Milch kommen vor allem alkalische Verseifung mit nachfolgender Extraktion des Unverseifbaren, Sterinfällung mit Digitonin und chromatographische Verfahren zur Anwendung. Hierzu zählen Papier-, Säulen- und Dünnschichtchromatographie auf Kieselsäure, Kieselgel, Celite, Aluminiumoxid, Sephadex oder Lipidex. Eine feinere Auftrennung ermöglichen Verfahren wie Gas- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Bei den in der Literatur beschriebenen Bestimmungsmethoden werden jeweils mehrere Isolierungsprozesse hintereinander durchgeführt.

Zur Quantifizierung können dienen:

1. UV-Absorptionsmessung

   Die D-Vitamine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 264 nm. Diese Methode setzt jedoch eine sehr sorgfältige Abtrennung von Störsubstanzen voraus, weil ansonsten die Spezifität zu gering ist.

2. Kolorimetrie

   Farbreaktionen, bei denen die Absorption des entstehenden Farbkomplexes zur Quantifizierung herangezogen wird, besitzen den Nachteil einer relativ geringen Empfindlichkeit und Spezifität.

Am bekanntesten ist die Brockmann-Chen-Reaktion mit Antimontrichlorid.

3. Gaschromatographie

Gaschromatographische Auftrennung und anschließende Quantifizierung mittels "electron capture detector" oder Massenspektrometrie ermöglichen die Bestimmung auch geringer Vitamin D-Mengen. Die Massenspektrometrie befähigt zur Unterscheidung zwischen verschiedenen, nahe verwandten Steroidstrukturen wie auch zwischen Vitamin D_2 und D_3 und ihren Metaboliten.
Mit der Eingabe in den Gaschromatographen findet eine thermische Umlagerung von Vitamin D zu Pyrocalciferol und Isopyrocalciferol statt, so daß im Chromatogramm zwei Peaks erscheinen.

4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie ermöglicht wie die Gaschromatographie eine sehr feine Auftrennung. Die Quantifizierung erfolgt mittels UV-Detektion anhand der Retentionszeit. Es ist möglich, zwischen Vitamin D_2 und D_3 sowie verschiedenen Metaboliten zu unterscheiden.

5. Kompetitive Proteinbindungsassays

Kompetitive Proteinbindungsassays sind sowohl für Vitamin D als auch 25-OH-D, $1,25(OH)_2D$, 24,25(OH)D und $25,26(OH)_2D$ entwickelt worden. Das Prinzip beruht darauf, daß Tritium-markiertes Vitamin D (oder je nach Assay einer seiner Metaboliten) durch unmarkiertes Vitamin D (bzw. dessen Metaboliten) der Testsubstanz von einem spezifischen Proteinrezeptor verdrängt wird. Über die

Messung der Radioaktivität im Medium läßt sich der Gehalt der Testsubstanz an Vitamin D bzw. des jeweiligen Metaboliten ermitteln. Kompetitive Proteinbindungsassays sind empfindlich, spezifisch und relativ schnell auswertbar. Sie finden in klinischen Labors breite Anwendung.

Im folgenden soll nun auf einige in der Literatur beschriebene Methoden zur Vitamin D-Bestimmung in der Milch eingegangen werden.

JONES et al. (1965) entwickelten eine Vitamin D-Bestimmungsmethode für supplementierte Kondensmilch. An zweimalige Verseifung und Ätherextraktion des Unverseifbaren schließen sich zwei säulenchromatographische Schritte auf Polyäthylenglycol-Celite und Florex XXS an. Die Quantifizierung erfolgt mittels Antimontrichlorid-Reaktion. In ähnlicher Weise verfahren EISSES et al. (1969), deren Methode zusätzlich eine Sterinfällung mit Digitonin bei der zweiten Verseifung beinhaltet. Die Säulenchromatographie wird auf Celite und Aluminiumoxid durchgeführt.

Ein Verfahren zur Bestimmung des Vitamin D-Gehaltes von Trockenmagermilch wurde von PANALAKS (1970) veröffentlicht. Proteinfällung mit Aceton und Äthanol, Fettextraktion mit Chloroform, Säulenchromatographie auf Kieselsäure, Antimontrichlorid-Reaktion, zweimalige Mikrosäulenchromatographie auf Kieselsäure und Gaschromatographie sind dabei die wesentlichen Schritte.

Von PANALAKS (1971) liegt zusätzlich eine Methode für supplementierte Voll- oder Teilmagermilch vor.

700 ml Milch werden zweimal verseift, gefolgt von Äther- bzw. Benzolextraktion. Es schließen sich vier säulenchromatographische Schritte mit folgenden Materialien an: 1. Digitonin, Celite; 2. Polyäthylenglycol-Celite; 3. Aluminiumoxid; 4. Kieselsäure. Die Quantifizierung erfolgt mittels Kolorimetrie (Antimontrichlorid-Reaktion).

Ein ebenfalls zahlreiche Arbeitsschritte beinhaltendes Verfahren für Vollmilchpulver mit Vitamin D-Zusatz stammt von BELL und CHRISTIE (1974). An Fettextraktion mittels Triton X-100 und Natrium-Hexametaphosphat und Extraktion mit Äther/Petroläther schließen sich Verseifung und eine weitere Ätherextraktion an. Es folgt eine zweimalige Chromatographie auf Aluminiumoxid-Säulen mit dazwischenliegender Antimontrichlorid-Reaktion und schließlich die Gaschromatographie.

Auch LE BOULCH et al. (1974) benutzen die Gaschromatographie. Ausgehend von zwei Litern Kuhmilch ohne Vitamin D-Zusatz folgen aufeinander: Proteinfällung mit Ammoniak/Äthanol, Lipidextraktion mit Äther, Verseifung und Zerreibung mit Celite, Säulenchromatographie entweder auf Kieselgel oder Sephadex LH 20 und Gaschromatographie.

Die von THOMPSON et al. (1977) und HENDERSON und WICKROSKI (1978) entwickelten Methoden weisen den Vorteil einer Verseifung bei Raumtemperatur über Nacht auf, wodurch die Entstehung von Isomerisierungsprodukten des Vitamin D vermieden wird. Die zuvor genannten Verfahren beinhalten hingegen eine "heiße" Verseifung. Ein weiterer Vorzug der Verfahren nach THOMPSON et al. (1977) und HENDERSON und WICKROSKI (1978) ist die Reduzierung der notwendigen

Analyseschritte. Beide Methoden sind für supplementierte Vollmilch konzipiert. THOMPSON et al. (1977) lassen auf die kalte Verseifung von 50 ml Milch Ätherextraktion, Hydroxyalkoxypropylsephadex (HAPS) Säulenchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie folgen. Bei HENDERSON und WICKROSKI (1978) schließen sich an die Verseifung von 100 ml Milch Äther/Petrolätherextraktion, Aluminiumoxid-Säulenchromatographie und HPLC an.

Ein Verfahren zur Vitamin D-Bestimmung in nicht supplementierter Milch wird von ADACHI und KOBAYASHI (1979) angegeben. Der Analysengang für 500 ml Milch besteht aus den folgenden Hauptschritten: Fettextraktion, heiße Verseifung, Extraktion mit Benzol, Digitonin-Celite-Säulenchromatographie, Kieselgeldünnschicht-Chromatographie und HPLC.

1982 wurden zwei neue Methoden zur routinemäßigen Bestimmung von Vitamin D in supplementierter Milch veröffentlicht. MUNIZ et al. (1982) führen nach Verseifung von 100 ml Milch bei Raumtemperatur und Ätherextraktion eine Cholesterol-Präzipitation mit Digitonin durch, gefolgt von Aluminiumoxid-Säulenchromatographie und HPLC.

Ausgehend von nur 15 ml Milch schließen sich nach THOMPSON et al. (1982) eine kalte Verseifung mit nachfolgender Extraktion des Unverseifbaren mit Hexan zwei hochdruckflüssigkeitschromatographische Schritte an.

Während die bisher aufgeführten Methoden mit Ausnahme derjenigen von LE BOULCH (1974) und ADACHI und KOBAYASHI (1979) entwickelt wurden, um den deklarierten Vitamin D-Gehalt von kommerziell gehan-

delter supplementierter Milch zu überprüfen, bestimmten HOLLIS et al. (1981) und REEVE et al. (1982) den natürlichen Gehalt an Vitamin D und seiner Metaboliten. Aufwendige Analysengänge waren hierzu erforderlich.

HOLLIS et al. (1981) unterwerfen 5 ml Milch folgenden präparativen Auftrennungsschritten: Extraktion mit Methanol/Methylenchlorid, Zentrifugierung, Neutralfettpräzipitation mit Methanol und Kieselsäure-Chromatographie. Als Elutionsmittel kommen dabei n-Hexan und Äthyläther zur Anwendung, deren Mischungsverhältnis allmählich zugunsten von Äthyläther verändert wird, sodaß zunächst Vitamin D, danach die polaren Metaboliten eluiert und in verschiedenen Fraktionen aufgefangen werden können. Es schließt sich, für die einzelnen Fraktionen unterschiedlich, Säulenchromatographie mit Lipidex 5000 oder Sephadex LH 20 an, gefolgt von HPLC. Die Quantifizierung von Vitamin D und den einzelnen Metaboliten wird mit kompetitiven Proteinbindungsassays durchgeführt.

REEVE et al. (1982) lyophilisieren 100 ml Milch, extrahieren mit Methanol/Chloroform und chromatographieren auf einer Sephadex LH 20-Säule, wobei vier Fraktionen aufgefangen werden. Der Gehalt an $24,25(OH)_2D$ und $1,25(OH)_2D$ ergibt sich nach diesem Verfahren aus den anschließenden Proteinbindungsassays, während die dem Vitamin D und 25-OH-D entsprechende Fraktion eine Lipidex 5000-Säulenchromatographie durchläuft. Die Quantifizierung erfolgt mittels UV-Detektion nach einem (für 25-OH-D) bzw. zwei (Vitamin D) hochdruckflüssigkeitschromatographischen Schritten.

Bei der Betrachtung der beschriebenen Methoden ist ersichtlich, daß für die Vitamin D-Bestimmung in supplementierter Milch mehrere im Hinblick auf Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Arbeitsaufwand praktikable Verfahren entwickelt wurden. Die Analyse von unsupplementierter Milch stellt jedoch erheblich höhere Anforderungen in technischer, apparativer und zeitlicher Hinsicht.

2.3. Goldhafer als mögliche Vitamin D_3-Quelle

Kalzinosen bei Weidetieren treten in verschiedenen Gegenden der Welt auf. In Argentinien und Brasilien wurde als Ursache die Aufnahme von Solanum malacoxylon erkannt (WORKER und CARILLO, 1967; DÖBEREINER et al., 1975). In Florida wird Kalzinose von Rindern und Pferden durch Cestrum diurnum ausgelöst (KROOK et al., 1975). Die enzootische Kalzinose des Voralpengebietes entsteht durch die Aufnahme von Goldhafer (Trisetum flavescens) (DIRKSEN et al., 1972).

Als kalzinogener Faktor wurde bei Solanum malacoxylon und Cestrum diurnum eine $1,25(OH)_2D_3$-Glycosidverbindung ermittelt (WASSERMAN, 1978).

Bei Goldhafer bestimmten RAMBECK et al. (1979) im Ätherextrakt einen Cholecalciferolgehalt von 100 µg/kg Trockensubstanz mittels HPLC und Gaschromatographie/Massenspektrometrie. ZUCKER et al. (1980) konnten nachweisen, daß Goldhafer, der von jeder UV-Bestrahlung abgeschirmt wird, kein Cholecalciferol enthält. Erst nach UV-Licht-Exposition wird Vitamin D_3 gebildet. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß das "tierische" Vitamin D_3 auch in einer Pflanze nach Bestrahlung mit UV-Licht entsteht.

Ein Teil des Cholecalciferols in Goldhafer liegt in estergebundener Form vor. Die Natur der Fettsäure ist noch nicht bekannt (RAMBECK et al., 1979).

Während RAMBECK et al. (1979) mittels analytischer Methoden weder 25-OH-D_3 noch $1,25(OH)_2D_3$ im Ätherextrakt von Goldhafer fanden, ermittelten PETERLIK et al. (1977) mittels biologischer Methoden in lyophilisiertem Gesamtgoldhafer geringe Mengen einer Substanz, die wie $1,25(OH)_2D_3$ wirkte.

DIRKSEN et al. (1981), ZUCKER und RAMBECK (1981) und MORRIS et al. (1982) entdeckten eine Vitamin D_3-artige Aktivität in wässrigen Extrakten von Goldhafer bzw. im Rückstand nach Ätherextraktion.

RAMBECK et al. (1982) inkubierten sowohl Vitamin D_3, $1,25(OH)_2D_3$ als auch Goldhafer mit Pansensaft. Dabei resultierte bei Vitamin D_3 eine starke Aktivitätsminderung, bei $1,25(OH)_2D_3$ war sie nur gering ausgeprägt. Der Goldhafer hingegen zeigte eine leichte Aktivitätszunahme der Vitamin D-artigen Wirksamkeit. Dabei war bemerkenswert, daß im Ätherextrakt eine Abnahme, im Ätherextraktrückstand jedoch eine starke Zunahme auftrat. Diese Ergebnisse sprechen für die Freisetzung eines Vitamin D-Metaboliten durch Pansensaft.

Während also im Ätherextrakt von Goldhafer Cholecalciferol in Höhe von etwa 100 µg/kg der pflanzlichen Trockensubstanz vorliegt, ist die chemische Natur des aktiven Faktors im Ätherextraktrückstand noch nicht geklärt.

In Anbetracht der erheblichen Goldhaferaufnahme mancher Weidetiere im Alpenvorland stellt sich die Frage, ob das auf diese Weise aufgenommene Vitamin D zu einer Erhöhung des Cholecalciferolgehaltes der Milch führt.

In Untersuchungen mit Milchschafen fanden RAMBECK et al. (1980) einen Gehalt von 100 IE Cholecalciferol pro Liter Milch bei Grünfütterung. Die Bestimmung erfolgte auf analytischem Wege mittels einer nach THOMPSON et al. (1977) modifizierten Methode. Nach 75-tägiger Aufnahme einer Ration mit 50 % Goldhafer stiegen die analytisch gefundenen Konzentrationen bis auf 1000 - 2000 IE Cholecalciferol pro Liter Milch. Die Autoren erwähnen, daß die Milchleistung innerhalb der Versuchsperiode sank, so daß ein gewisser Konzentrierungseffekt möglich wäre.

3. PROBLEMSTELLUNG

Nachdem RAMBECK et al. (1980) bei Schafen nach Goldhaferfütterung eine erhebliche Erhöhung der Vitamin D_3-Konzentration der Milch beobachtet hatten, stellte sich die Frage, ob dieses auch für Kuhmilch zutrifft.

Bei dem häufigen Vorkommen von Goldhafer auf den Weiden des Voralpengebietes erscheint dieses von praktischer Bedeutung, denn die kontinuierliche Aufnahme von erheblichen Vitamin D-Mengen über das Lebensmittel Milch wäre in Hinblick auf das Entstehen einer Hypervitaminose nicht unbedenklich.

In Versuchen mit Kühen, deren Futter zum Großteil aus Goldhafer bestand, sollte geklärt werden, ob die Aufnahme von Trisetum flavescens zu einer Erhöhung der Vitamin D_3-Konzentration führt. Gleichzeitig sollte die Serumkonzentration an 25-OH-Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2$-Vitamin D_3 untersucht werden. Da in Goldhafer neben Cholecalciferol auch eine noch unbekannte metabolitartige Komponente vorliegt, interessierte die Frage, wie sich diese auf den Gehalt an 25-OH-D_3 und 1,25$(OH)_2D_3$ im Serum auswirkt. Während bei der Erhöhung der 25-OH-D_3-Konzentration auf das Vorhandensein von Vitamin D_3 oder 25-OH-D_3 geschlossen werden kann, läßt die Erhöhung von 1,25$(OH)_2D_3$ vermuten, daß ein in 1α-Stellung hydroxyliertes Vitamin D-Derivat vorliegt. Damit wären bei einer Erhöhung im Serum gewisse Rückschlüsse auf die Natur der auslösenden Substanz zu ziehen.

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1. Tiermaterial, Haltung und Fütterung

Als Versuchstiere dienten Fleckvieh-Kühe des Lehr- und Versuchsgutes Schleißheim der Universität München. Die Tiere waren bei einstreuloser Anbindehaltung ganztägig aufgestallt.
Die Fütterung während Versuch I und II ist den Tabellen 5 - 8 zu entnehmen.

4.2. Probengewinnung

In beiden Versuchen wurden während der Vor- und Nachperiode zweimal wöchentlich jeweils 100 ml Milch gewonnen. Während der eigentlichen Versuchsperiode erfolgte in Versuch I die Probennahme täglich morgens und abends, in Versuch II zweimal wöchentlich. Die Proben wurden am Tage der Gewinnung bei -18°C eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt.

Tabelle 5: Fütterung während Versuch I
(pro Tier und Tag)

Vorperiode (14 Tage) 4.5.81 - 17.5.81	Vorbereitungsfütterung 4.5.81 - 10.5.81 3 kg Heu 25 kg Maissilage 2,5 kg Cobs 1-4 kg Kraftfutter 150 g Vit.D-freies Mineralfutter
	Übergangsfütterung 10.5.81 - 17.5.81 3 kg Heu Grünfutter 150 g Vit.D-freies Mineralfutter
Versuchsperiode (20 Tage) 18.5.81 - 6.6.81	3 kg Heu 150 g Vit.D-freies Mineralfutter Gras (Kontrollkühe) bzw. Goldhafer (Versuchskühe)
Nachperiode (11 Tage) 6.6.81 - 16.6.81	Heu Maissilage

Tabelle 6: Fütterung während der Versuchsperiode I
(zusätzlich zu Heu und Mineralfutter)

Kuh Nr.	784	790	655	673
Futter	Gras	Gras	Goldhafer	Goldhafer

Tabelle 7: Fütterung während Versuch II
(pro Tier und Tag)

Vorbereitungs-periode (16 Tage) 14.6.82 - 29.6.82	Maissilage Grünfutter 3 kg Heu 150 g Vit.D-freies Mineralfutter
Vorperiode (7 Tage) 29.6.82 - 6.7.82	3 kg Heu 40 kg Gras 150 g Vit.D-freies Mineralfutter
Versuchsperiode (21 Tage) 6.7.82 - 26.7.82	3 kg Heu 150 g Vit.D-freies Mineralfutter 40 kg Gras (Kontrollkühe) bzw. 35 kg Goldhafer (Versuchskühe) bzw. 40 kg Gras + 200.000 IE Vit. D_3 (Vit. D_3-Kuh)
Nachperiode (7 Tage) 26.7.82 - 2.8.82	Heu Grünfutter Maissilage

Tabelle 8: Fütterung während Versuchsperiode II
(zusätzlich zu Heu und Mineralfutter)

Kuh Nr.	714	787	655	788	775
Futter	Gras	Gras	Goldhafer	Goldhafer	Gras + Vit.D_3

4.3. Methode

4.3.1. Vitamin D_3-Bestimmung in der Milch

Zur Vitamin D_3-Bestimmung in der Milch kam die von THOMPSON et al. 1977 entwickelte Methode in etwas modifizierter Weise zur Anwendung. In der ursprünglichen Form folgt auf Verseifung bei Raumtemperatur und Ätherextraktion eine Säulenchromatographie mit Hydroxyalkoxypropyl-Sephadex (HAPS) als Füllmaterial und n-Hexan als flüssiger Phase. An die Säule ist ein UV-Detektor angeschlossen, der die Extinktion des Eluates bei 254 nm mißt. Das dabei aufgezeichnete Chromatogramm ermöglicht das Auffangen der Vitamin D-haltigen Fraktion. Zur Überprüfung des chromatographischen Verhaltens von Vitamin D fügten THOMPSON und Mitarbeiter tritiummarkiertes Vitamin D zu und sammelten in 80 Sekunden-Intervallen portionsweise das Eluat. Anhand der Radioaktivitätsverteilung ließ sich nachweisen, daß die über die Extinktionsbestimmung aufgefangene Fraktion den größten Teil des Vitamins enthielt.
An die Säulenchromatographie schließt sich die eigentliche Quantifizierung des Cholecalciferols mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Extinktionsmessung bei 265 nm an. Hierfür wird ein aliquoter Teil der Vitamin D-haltigen Fraktion in einer 25 x 3,2 mm LiChrosorb Si 60 5 µm Kieselsäure-Säule mit 0,6 % Isopropanol in n-Hexan als Laufmittel chromatographiert. Die Auswertung des aufgezeichneten Chromatogramms erfolgt über den Vergleich mit Standardlösungen.

Vorzüge der Methode nach Thompson liegen in

1. der verhältnismäßig geringen Ausgangsmenge von 50 ml Milch mit Einsparung an Extraktionsmitteln und reduziertem technischen Aufwand;
2. der Vermeidung hoher Temperaturen und damit der Bildung von Isomerisierungsprodukten des Vitamin D;
3. der Abtrennung von Störsubstanzen bei der HAPS-Säulenchromatographie. Da das Säulenfüllmaterial problemlos nach jeder Benützung gereinigt werden kann, wird das empfindliche System des HPLC geschont;
4. der Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, die auch bei sehr geringen Substanzmengen eine Quantifizierung ermöglicht.

Bei unseren Milchanalysen wurden drei Modifikationen durchgeführt:

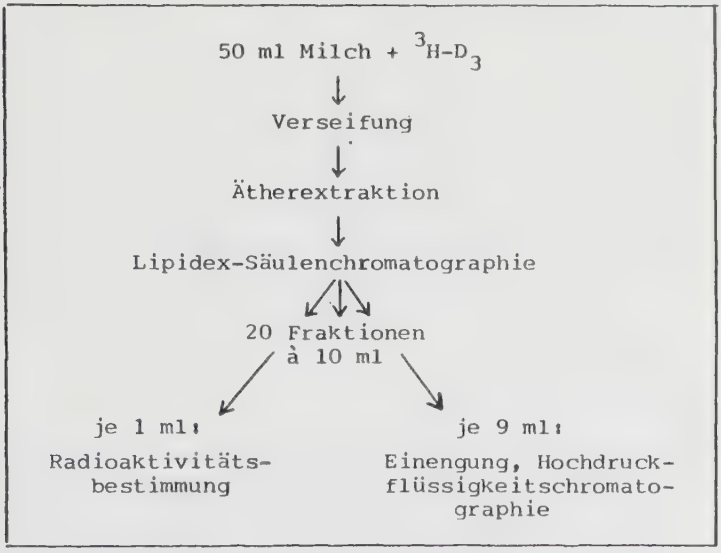
Zur Identifizierung des Vitamin D-haltigen Anteiles des Eluates geben wir vor der Verseifung Tritiummarkiertes Vitamin D_3 zu. Bei der Lipidex-Säulenchromatographie werden durch einen automatischen Fraktionierer 20 Portionen aufgefangen, von denen jeweils ein aliquoter Teil zur Radioaktivitätsmessung gelangt. Da sich das tritierte Vitamin D_3 chromatographisch wie das unmarkierte verhält, lassen sich die cholecalciferolhaltigen Fraktionen anhand der bestimmten CPM erkennen.

Als Säulenfüllungsmaterial wurde anstelle des selbst herzustellenden Hydroxyalkoxypropylsephadex das

kommerziell erhältliche Lipidex 5000 verwendet, welches HAPS entspricht und von der Firma Packard Instrument hergestellt wird.

Bei der HPLC wurden andere Trennsäulen benutzt (s. S. 39). Die Extinktionsmessung erfolgte bei 254 nm, als Laufmittel diente n-Hexan mit 2,5 % Isopropanol.

Schema: Methode zur Vitamin D_3-Bestimmung in Milch (modifiziert nach THOMPSON et al., 1977)



Verseifung

50 ml Milch, denen 0,05 µ Ci ^{3}H-Vitamin-D_3 zugesetzt werden, werden mit 50 ml Äthanol und 17,5 g KOH-Plättchen versetzt. Anschließend wird etwa zwanzig Minuten im kalten Wasserbad gekühlt, um Verluste an Vitamin D durch die entstehende Wärme zu vermeiden. Die Probe bleibt über Nacht an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur zur kalten Verseifung stehen.

Extraktion

Am folgenden Tag wird die Probe in einen Schütteltrichter überführt und mit je 50 ml Äther fünfmal hintereinander ausgeschüttelt. Das Ätherlösliche wird in einem zweiten Schütteltrichter gesammelt; das Wasserlösliche nach fünfmaligem Ausschütteln verworfen. Man wäscht das gesammelte Ätherlösliche mit je 20 ml destilliertem Wasser, wobei die erste wasserlösliche Portion mit Äther rückextrahiert wird. Das Waschen erfolgt bis ein neutraler pH-Wert erreicht ist. Danach wird die Probe im rotierenden Destillierkolben bei nicht mehr als 50°C bis zur Trockne eingeengt und der Rest in 5 ml n-Hexan aufgenommen.

Säulenchromatographie

Eine Glassäule von 1 cm Durchmesser wird mit Lipidex 5000 der Firma Packard Instrument auf eine Höhe von etwa 35 cm gepackt. Als Elutionsmittel dient n-Hexan. Das Säulenfüllmaterial wird durch Waschen mit Äthanol, Äther und n-Hexan regeneriert.
Die Säule ist an einen automatischen Fraktionssammler angeschlossen. Es werden 20 Fraktionen à 10 ml aufgefangen.

Im Anschluß an die Säulenchromatographie werden die einzelnen Fraktionen auf je 10 ml aufgefüllt. Davon gelangt jeweils 1 ml zur Radioaktivitätsbestimmung im Szintillationszähler. Aufgrund des anfangs zugesetzten Tritium-markierten Cholecalciferols lassen sich so die Vitamin D-haltigen Fraktionen ermitteln.

Die betreffenden Fraktionen werden im Warmwasserbad unter Vakuum bis zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 0,5 ml n-Hexan aufgenommen.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wird auf einem System der Firma Waters Associates durchgeführt, bestehend aus einem Einspritzsystem (Modell U 6 K), einer HPLC-Pumpe (Modell M 6000 A) und einem UV-Detektor (Modell 440). Daran angeschlossen ist ein Schreiber (Philips PM 8222). Zur Auftrennung dienen µ-Porasil-Säulen von Waters, die Silicagelkügelchen als stationäre Phase enthalten. Es werden entweder 25 cm x 5 mm µ-Porasil-Säulen benutzt oder radialkomprimierte µ-Porasil-Säulen (5 mm Waters Radial Pak Liquid Chromatography Cartridge; RCM-100 Cartridge Holder and Compression Chamber). Die Extinktion wird bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Als flüssige Phase kommt n-Hexan mit 2,5 % Isopropanol zur Anwendung. Als Standard dient kristallines Vitamin D_3 der Firma Merck nach Verdünnung auf 400 IE Vitamin D_3 pro Milliliter.

Auswertung des Chromatogramms und Berechnung des Vitamin D_3-Gehalts

Die Identifizierung des Vitamin D_3 erfolgt mittels des oben beschriebenen Standards. Die einzelnen Proben werden zweimal chromatographiert, das zweite Mal unter Zusatz des Standards. An der Retentionszeit erkennt man das Auftreten von Vitamin D_3. Zusätzlich

kann davon ausgegangen werden, daß nur in Fraktionen, die bei der Radioaktivitätsbestimmung hohe Werte aufweisen, meßbare Vitamin D_3-Konzentrationen auftreten können. In anderen Fraktionen handelt es sich um interferierende Substanzen, die nicht mit Vitamin D_3 identisch sind.

Für die Quantifizierung wird eine genau bemessene Menge des Standards unter gleichen Bedingungen wie die Probe chromatographiert. Zur Auswertung vergleicht man die Höhe des Peaks der Probe mit derjenigen des Standards, wobei davon ausgegangen wird, daß die Höhe des Peaks der Menge an Vitamin D_3 proportional ist.

Grenzen der Methode

Bei der gewählten Einstellung von Empfindlichkeit, Pumpenförderleistung und Papiertransportgeschwindigkeit entsprachen in unseren Chromatogrammen 4 IE Vitamin D_3 im allgemeinen einer Peakhöhe von etwa 65 mm. Wenn man die niedrigste auswertbare Peakhöhe mit 5 mm annimmt, ergibt sich eine untere bestimmbare Vitamin D_3-Konzentration von ca. 60 IE je Liter Milch. Damit liegt die Nachweisgrenze der angewandten Methode höher als der natürliche Vitamin D_3-Gehalt der Milch, der etwa 10 IE/l beträgt. Die wichtigsten Schritte der Analyse entsprechen der Methode von THOMPSON (1977), die eigentlich für Milch mit 300-400 IE Vitamin D_3 pro Liter konzipiert war. Bei einer wesentlichen Erhöhung der Vitamin D_3-Konzentration der Milch nach Goldhaferfütterung wären jedoch Verhältnisse ähnlich wie bei supplementierter Milch zu erwarten, so daß die Methode zur Lösung der Fragestellung geeignet erscheint.

Überprüfung der Methode

Zur Überprüfung der Methode wurde einigen Proben Vitamin D_3 als externer Standard zugesetzt. Die Proben stammten entweder von Kontrollkühen oder, im Fall der Vitamin D_3-Kuh 775, aus der Vorperiode. Der Zusatz von Cholecalciferol erfolgte vor der Verseifung; es wurden, wie bei der Schilderung der Methode angegeben, jeweils 50 ml Milch aufgearbeitet.

Kuh Nr.	Probe vom	Zusatz an Vit.D_3	Ergebnis
714	12.7.82	100 IE/l	130 IE/l
714	12.7.82	200 IE/l	240 IE/l
787	15.7.82	kein Zusatz	120 IE/l
787	15.7.82	100 IE/l	360 IE/l
787	2.8.82	100 IE/l	500 IE/l
775	28.6.82	kein Zusatz	keine Erhöhung
775	28.6.82	80 IE/l	80 IE/l

Bei den Proben der Kuh 775 vom 28.6.82 entspricht die Wiederfindungsquote dem Zusatz an Vitamin D_3. In den anderen Fällen liegen die bestimmten Werte über der Menge an zugegebenem Standard. Der natürliche Vitamin D_3-Gehalt der Milch von etwa 10 IE je Liter dürfte dabei eine geringe Rolle spielen. Es ist anzunehmen, daß insbesondere bei der Kuh 787 vom 2.8.82, Substanzen, die in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften dem Cholecalciferol nahe verwandt sind, zu einer scheinbaren Erhöhung des Vitamin D_3-Gehaltes führen. Somit ist die angewandte Methode zur Bestimmung relativ niedriger Vitamin D_3-Konzentrationen nicht geeignet, wohl aber zur Beantwortung der Frage, ob nach Goldhaferfütterung eine bedeutende Erhöhung des Vitamin D_3-Gehaltes auftritt.

4.3.2. 25-OH-Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2$-Vitamin D_3-Bestimmung im Serum

Die 25-OH-Vitamin D_3- und 1,25$(OH)_2$-Vitamin D_3-Bestimmungen im Serum wurden mittels kompetitiven Proteinbindungsassays nach MALLON et al. (1980) von Frau U. Hennes, Hormon Analytisches Labor, Pharma Forschung, Firma Hoffmann-La Roche und Co., Basel, durchgeführt.

4.4.1. Ergebnisse der Vitamin D_3-Bestimmung in der Milch

Da sich nach stichprobenartigen Bestimmungen bereits ein klares Bild abzeichnete, wurde auf die Untersuchung sämtlicher gewonnener Proben verzichtet und nur die besonders interessierenden sowie einige Kontrollen analysiert. Die durchgeführten Analysen sind Tabelle 9 und 10 zu entnehmen.

Versuch I

Von 19 durchgeführten Einzelbestimmungen war in 14 Fällen überhaupt keine Vitamin D_3-Erhöhung in der Milch festzustellen. Dieses betraf gleichermaßen Kontroll- wie Goldhaferkühe.

Im einzelnen sollen diejenigen Fälle genauer betrachtet werden, in denen eine UV-Absorption der Probe zu einer scheinbaren Vitamin D_3-Erhöhung führge. So fand sich in Milch der Kontrollkuh 790 vom 19.5.81 ein Vitamin D_3-Gehalt von 80 IE je Liter; davor, am 5.5.81, und danach, am 5.6.81, konnte jedoch in der Milch derselben Kuh kein Vitamin D_3 nachgewiesen werden. Ähnliche Verhältnisse lagen bei der Goldhaferkuh 673 vor, bei der in der Vorperiode (5.5.81) 60 IE je Liter Milch gefunden wurden, in der Versuchs- und Nachperiode jedoch kein Vitamin D_3. Die bei diesen beiden Kühen gefundenen Werte liegen an der untersten Bestimmungsgrenze. Zudem handelt es sich bei den Proben um Milch eines Kontrolltieres oder aus der Vorperiode, wo keine Vitamin D_3-Erhöhung in der Milch zu erwarten wäre.

In zwei Milchproben von Goldhaferkühen schien ebenfalls Vitamin D_3 in einer Menge knapp über der Nachweisgrenze vorzuliegen. Es zeigte sich jedoch, daß die erhöhte UV-Absorption in Lipidex-Fraktionen auf-

Tabelle 9: Versuch I: Auf Vitamin D_3 untersuchte Milchproben (X)

	Milchprobe vom:	Kontrolle		Goldhafer	
	Kuh Nr.	784	790	655	673
Vorperiode	5.5.81		X		X
Versuchsperiode	19.5.81		X		X
	1.6.81			X	X
	3.6.81	X			X
	4.6.81		X	X	X
	5.6.81	X	X	X	X
Nachperiode	11.6.81			X	
	16.6.81			X	X

Tabelle 10: Versuch II: Auf Vitamin D_3 untersuchte Milchproben (X)

	Milchprobe vom:	Kontrolle		Goldhafer		Vitamin D_3
	Kuh Nr.	714	787	655	788	775
Vorperiode	28.6.82			X	X	X
Versuchsperiode	15.7.82		X	X	X	
	19.7.82	X	X	X	X	X
	22.7.82	X	X	X	X	X
Nachperiode	2.8.82	X			X	X

trat, die nur geringe Mengen des als Marker zugesetzten ^{3}H-Vitamin D_3 enthielten (siehe Diagramm).

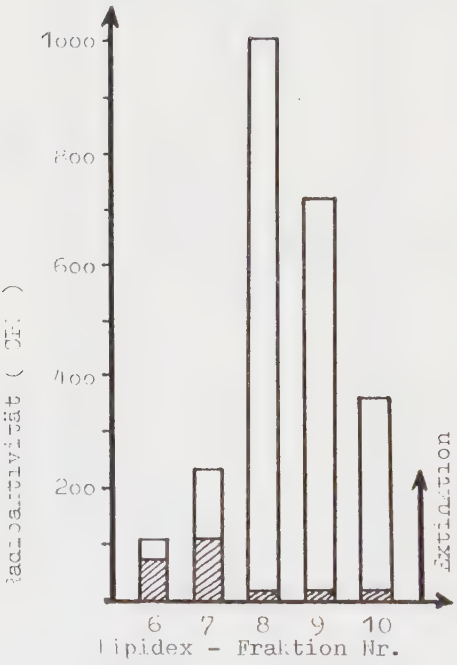


Diagramm 1: Milchprobe der Kuh 673 vom 4.6.81
Radioaktivität ⊓
und Extinktion bei 254 nm ▨

Dieses bedeutet, daß Nicht-Vitamin D-Verbindungen mit identischer Retentionszeit wie Vitamin D_3 bei der HPLC-Chromatographie eine UV-Absorption ergaben und so Vitamin D_3 vortäuschten.

Damit liegt auch in den Fällen, die eine geringfügige Vitamin D_3-Erhöhung aufzuweisen schienen, wie in den übrigen 14 Fällen kein erhöhter Vitamin D_3-Gehalt in der Milch vor.

Versuch II

Von 19 durchgeführten Einzelbestimmungen war in 13 Fällen keine Vitamin D_3-Erhöhung in der Milch feststellbar. Dabei war kein Unterschied zwischen den negativen Kontrollen, den Goldhaferkühen und der mit Vitamin D_3-Zulagen gefütterten Kuh zu erkennen.

So wiesen keine der Milchproben der Kontrollkuh 714 und der Goldhaferkuh 788 eine erhöhte Cholecalciferol-Konzentration in der Milch auf.

Milchproben der Kontrollkuh 787 vom 15.7.82, der Goldhaferkuh 655 vom 15.7.82, der Goldhaferkuh 788 vom 2.8.82 und der Vitamin D_3-Kuh 775 vom 2.8.82 enthielten scheinbare Vitamin D_3-Konzentrationen von über 100 IE je Liter. Aus der Verteilung des radioaktiven Marker-Vitamin D_3 auf die Lipidexfraktionen läßt sich jedoch vermuten, daß auch hier, wie bei einzelnen Proben von Versuch I, Fremdsubstanzen mit Vitamin D_3-identischer Retentionszeit einen erhöhten Vitamin D_3-Gehalt der Milch vortäuschen. Dafür spricht auch die Tatsache, daß eine dieser Proben von einer Kontrollkuh stammt und zwei weitere aus der Goldhafer- bzw. Vitamin D_3-Zulagen-freien Nachperiode.

4.4.2. Futteraufnahme während Versuch II

Die tägliche Futteraufnahme der fünf Versuchskühe ist in Tabelle 11 aufgeführt. Ab dem 20.7.82 fiel der Goldhaferverzehr stark ab. Zu dieser Zeit wies der verfütterte Goldhafer eine sehr trockene Qualität auf. Nach 5 Tagen, als wieder feuchter Goldhafer gereicht wurde, stieg die Futteraufnahme wieder an.

Tabelle 11: Gras- bzw. Goldhaferaufnahme während des II. Versuches (in kg)

Datum	Kontrolle		Goldhafer		Vit.D_3Kuh
	714	787	655	788	775
29.6.	40	37	40	40	37
30.6.	40	39	39	37	34
1.7.	39	37	39	36	35
2.7.	39	38	39	37	37
3.7.	39	38	38	40	37
4.7.	39	37	38	36	36
5.7.	36	38	39	36	37
6.7.	32	34	27	28	36
7.7.	35	35	30	30	36
8.7.	36	36	35	34	37
9.7.	38	37	35	35	37
10.7.	38	37	35	35	37
11.7.	37	37	35	35	38
12.7.	37	36	35	35	37
13.7.	38	37	30	30	37
14.7.	35	38	31	35	36
15.7.	35	37	32	35	36
16.7.	37	36	35	35	35
17.7.	36	39	32	34	38
18.7.	32	35	28	31	36
19.7.	34	35	27	18	35
20.7.	38	32	12	18	38
21.7.	35	36	13	11	35
22.7.	36	34	12	13	35
23.7.	37	32	12	11	36
24.7.	36	34	14	12	37
25.7.	38	29	22	21	40
26.7.	38	40	25	21	39

4.4.3. Ergebnisse der Calcium- und Phosphorbestimmungen im Serum

An der II. Medizinischen Tierklinik der Universität München wurden im Rahmen des zweiten Versuches Serumbestimmungen von Calcium und Phosphor durchgeführt: Die Calciumserumkonzentration lag bei den negativen Kontrolltieren und der Vitamin D_3-Kuh währen des gesamten Zeitraumes bei mittleren physiologischen Werten. Bei den Goldhaferkühen traten nach Beginn der Trisetum flavescens-Fütterung Konzentrationen auf, die im oberen Bereich des Physiologischen liegen, mit Höchstwerten von 12,2 ml/dl am 13. Tag nach Beginn der Goldhaferfütterung.

Auch die Serumwerte von anorganischem Phosphor lagen bei den negativen Kontrollkühen und der Vitamin D_3-Kuh im Normalbereich (um 6 - 7 mg/dl). Hingegen stiegen sie bei den Tieren, die Goldhafer aufnahmen, zu Beginn der Versuchsperiode steil an und erreichten am 10. Tag der Goldhaferfütterung einen Maximalwert von 10,9 mg/dl.(DIRKSEN, 1983, persönliche Mitteilung).

4.4.4. Ergebnisse der Serum-25-OH-D_3- und $1,25(OH)_2D_3$-Bestimmung

Im Rahmen des zweiten Fütterungsversuches wurden die Serumkonzentrationen an 25-OH-D_3 und $1,25(OH)_2D_3$ der fünf Versuchskühe bestimmt. Die Ergebnisse sind Tabelle 12 und 13 zu entnehmen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Serum-25-OH-D_3-Gehalt der mit Goldhafer gefütterten Kühe sich nicht wesentlich von dem der Kontrolltiere

Tabelle 12: Ergebnisse der Serum-25-OH-D_3-Bestimmung (ng/ml)

	Probe vom:	Kontrolle Kuh Nr. 714	787	Goldhafer 655	788	Vitamin D_3 775
Vorperiode	28.6.82	25	25	25	59	60
Versuchs-periode	12.7.82	28	33	31	13	28
	15.7.82	28	41	45	17	78
	19.7.82	29	28	27	25	51
	22.7.82	4	87	57	57	71
	26.7.82	42	44	34	53	64
Nachperiode	29.7.82	39	46	27	52	70

Tabelle 13: Ergebnisse der Serum-1,25$(OH)_2D_3$-Bestimmung (pg/ml)

	Probe vom:	Kuh Nr.	Kontrolle 714	Kontrolle 787	Goldhafer 655	Goldhafer 788	Vitamin D_3 775
Vorperiode	28.6.82		44	94	80	65	50
Versuchs-periode	12.7.82		33	18	24	59	52
	15.7.82		39	54	144	148	66
	19.7.82		29	47	39	69	39
	22.7.82		25	95	47	72	28
	26.7.82		35	44	37	40	54
Nachperiode	29.7.82		39	31	38	39	57

unterschied, während bei der Kuh, deren Grünfutter täglich mit 200.000 IE Vitamin D_3 supplementiert wurde, eine Erhöhung festzustellen war. Die Serum-$1,25(OH)_2D_3$-Konzentrationen der mit Vitamin D_3 gefütterten Kuh wichen nicht von den bei den Kontrolltieren gemessenen ab. Hingegen war der Gehalt dieses Metaboliten im Serum von Kühen nach 9 Tagen einer Fütterung mit Trisetum flavescens erhöht. Innerhalb von 4 Tagen danach fiel diese Konzentration wieder ab.

4.5. Diskussion

4.5.1. Ergebnisse der Bestimmung von Vitamin D_3 in der Milch

Bei dreiwöchiger Fütterung von Goldhafer oder 200.000 IE Vitamin D_3 am Tag an Kühe ließ sich keine Cholecalciferolerhöhung der Milch über die untere Nachweisgrenze der Methode von etwa 80 IE je Liter feststellen. In einigen Fällen wurden im HPLC-Chromatogramm Peaks gefunden, deren Retentionszeit derjenigen von Cholecalciferol entsprach. Hierbei konnte es sich jedoch nicht um Vitamin D_3 handeln, da das zur Markierung zugesetzte ^{3}H-Vitamin D_3 in diesen Fällen eine andere Retentionszeit auf der Lipidex-Säule aufwies.

RAMBECK et al. (1979, 1981) ermittelten einen Cholecalciferolgehalt von 3000 - 4000 IE pro kg Trockensubstanz Goldhafer. Bei Verzehr von jeweils etwa 10 kg Trockensubstanz Goldhafer betrug die tägliche Vitamin D_3-Aufnahme unserer Versuchskühe somit etwa 30.000 IE.

Nach HOLLIS et al. (1981) ist die Steigerung der antirachitischen Gesamtaktivität der Milch bei Erhöhung der oralen Vitamin D_3-Gabe vor allem durch Zunahme des Cholecalciferolgehaltes bedingt; die Konzentration der Metaboliten erhöht sich in geringerem Maße. Die Erhöhung von 1,7 IE je Liter bei Aufnahme von 4000 IE am Tag auf 13 IE je Liter bei 40.000 IE am Tag führt jedoch zu einem - absolut gesehen - immer noch sehr geringen Cholecalciferolgehalt der Milch. REEVE et al. (1982) stellten bei täglicher Fütterung von 215.000 IE Vitamin D_3 eine

biologische Gesamtaktivität von 80 IE je Liter Milch fest, wobei Vitamin D_3 nur für einen Teil der Aktivität verantwortlich ist.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denjenigen von HOLLIS et al. und REEVE et al. insofern überein, als weder bei einer täglichen Aufnahme von etwa 30.000 IE Vitamin D_3 über Goldhafer noch von 200.000 IE reinem Cholecalciferol eine Vitamin D_3-Erhöhung über 80 IE je Liter beobachtet werden konnte.

Die von RAMBECK et al. (1980) in Versuchen mit Schafen festgestellte starke Erhöhung des Vitamin D_3-gehaltes der Milch nach Goldhaferfütterung ließ sich somit bei Kühen nicht nachweisen. Gründe hierfür können in tierartlichen Unterschieden liegen. So ist daran zu denken, daß bei der auf Milchleistung besonders selektierten Tierart Rind ein stärkerer Verdünnungseffekt auftreten könnte als bei Schafen. Während bei den Schafen einer Aufnahme von etwa 1 kg Goldhafertrockensubstanz täglich eine Milchmenge von 1 Liter entsprach, nahmen die Kühe etwa 10 kg Goldhafertrockensubstanz auf bei einer täglichen Milchleistung von etwa 15 - 20 Litern. Somit standen der Aufnahme von je 1 kg Goldhafertrockensubstanz bei den Schafen eine Milchmenge von 1 Liter gegenüber, bei den Kühen 1,5 - 2 Liter. Hiermit alleine läßt sich jedoch nicht die Tatsache erklären, daß bei Schafen die Vitamin D_3-Konzentration in der Milch bei Aufnahme von frischem Goldhafer auf 1000 - 2000 IE pro Liter stieg, während sie bei Kühen unter 80 IE pro Liter blieb.

4.5.2. Ergebnisse der Serum-25-OH-D_3- und $1,25(OH)_2D_3$-Bestimmung

Die Serumkonzentration an 25-OH-D_3 erhöhte sich bei der täglichen Aufnahme von 200.000 IE Vitamin D_3, nicht jedoch bei Goldhaferfütterung. Hingegen stieg die Serumkonzentration von $1,25(OH)_2D_3$ bei beiden Goldhaferkühen am 10. Tage der Fütterung steil an. Nach weiteren 4 Tagen erfolgte ein Abfall.

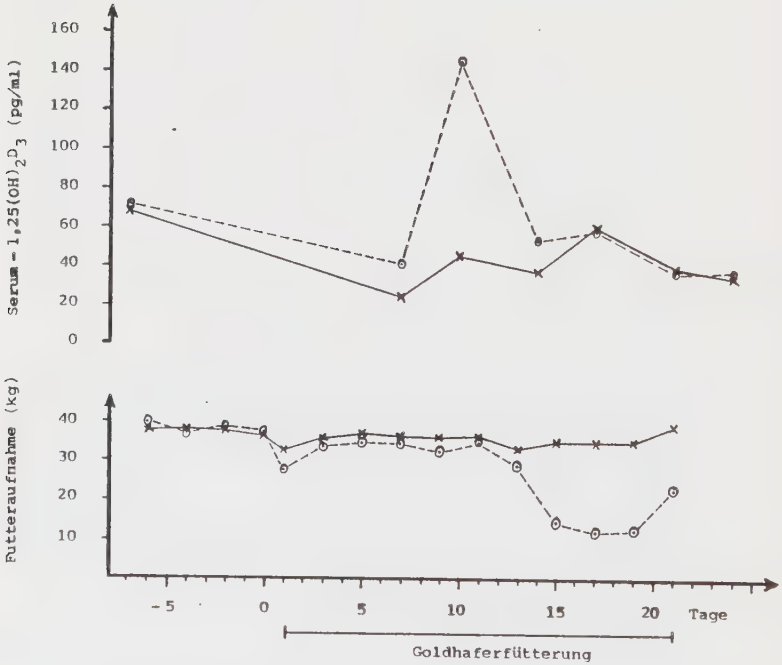
Bei der Betrachtung der Schwankungen der Serum-$1,25(OH)_2D_3$-Konzentration der Goldhaferkühe ist besonders der Vergleich mit der Futter-, d.h. Goldhaferaufnahme interessant (s. auch Diagramm 2). Die Futteraufnahme fiel bei beiden Tieren ab dem 10. Tag der Versuchsperiode um mehr als die Hälfte ab, was der zu dieser Zeit sehr trockenen Goldhaferqualität zugeschrieben wurde. Ab dem 20. Tag, als wieder feuchter Goldhafer gereicht wurde, stieg die Futteraufnahme erneut an. Diese mengenmäßig sehr unterschiedliche Goldhaferaufnahme entspricht in ihrem zeitlichen Verlauf in etwa den Schwankungen des Serumgehaltes an $1,25(OH)_2D_3$. Möglicherweise ist somit der Anstieg der Serum-$1,25(OH)_2D_3$-Werte durch die Goldhaferaufnahme und der Abfall durch den verminderten Verzehr bedingt.

Da das aufgenommene Vitamin D in relativ wenig reguliertem Maße zu 25-OH-D verwandelt wird, erfolgt bei einer Steigerung der Vitamin D-Aufnahme eine Erhöhung der Serumkonzentration an 25-OH-D.

Dieses bestätigte sich auch in unseren Versuchen bei der Kuh, die täglich 200.000 IE Vitamin D_3 erhielt, während die Aufnahme von bis zu 30.000 IE Vitamin D_3 am Tag über Goldhafer keine Erhöhung der

Diagramm 2:

Futteraufnahme und Konzentration von $1,25(OH)_2D_3$ im Serum. Mittelwerte von Kontrollkühen (x—x) und Goldhaferkühen (o--o)



Serumkonzentration an 25-OH-D hervorrief.

Der Gehalt des hochaktiven $1,25(OH)_2D$ im Serum wird durch verschiedene Steuerungsmechanismen reguliert und dem Bedarf angepaßt. Eine Erhöhung tritt jedoch ein, wenn die Hydroxylierung in der Niere durch direkte Zufuhr eines in 1α-Stellung hydroxylierten Metaboliten umgangen wird.

Die Tatsache, daß nach Goldhaferfütterung eine Erhöhung der $1,25(OH)_2D_3$-Serumkonzentration aufzutreten scheint, spricht für das Vorhandensein eines solchen 1α-OH-Metaboliten im Goldhafer. Umgekehrt deutet das Ausbleiben einer $25\text{-OH-}D_3$-Erhöhung im Serum nach Aufnahme von Trisetum flavescens darauf hin, daß es sich bei der metabolitartigen Komponente in Goldhafer nicht um Vitamin D_3 oder $25\text{-OH-}D_3$ handelt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Da Rinder in Kalzinosegebieten bei Verzehr von frischem oder getrocknetem Goldhafer erhöhte Mengen an Vitamin D_3 aufnehmen, wurde untersucht, ob damit eine Steigerung des Vitamin D_3-Gehaltes der Milch verbunden ist. Durch gleichzeitige Bestimmung von 25-OH-Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2$-Vitamin D_3 im Serum wurde der Frage nach der Natur der noch unbekannten metabolitartigen Komponente in Goldhafer nachgegangen.

In zwei Fütterungsversuchen erhielten je zwei Kühe Goldhafer als Hauptfuttermittel, während zwei andere Tiere mit Goldhafer-freiem Gras gefüttert wurden. Im 2. Versuch erhielt eine weitere Kuh zusätzlich zu Gras täglich 200.000 IE Vitamin D_3. Die Goldhafer- bzw. Vitamin D_3-Fütterung erstreckte sich jeweils über drei Wochen.

Die Bestimmung von Vitamin D_3 in der Milch erfolgte mittels einer nach THOMPSON et al. (1977) modifizierten Methode, deren Hauptschritte aus Verseifung, Ätherextraktion des Unverseifbaren, Lipidex-Säulenchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestanden.

Die Bestimmung von 25-OH-Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2$-Vitamin D_3 im Serum wurde mittels kompetitiven Proteinbindungsassays nach MALLON et al. (1980) durchgeführt.

Bei der Milchanalyse ergab sich, daß die Vitamin-D_3-Konzentration bei Goldhaferfütterung zu keinem Zeitpunkt über 80 IE je Liter, die untere Nachweisgrenze der angewandten Methode, anstieg.

Die 25-OH-Vitamin-D_3-Konzentration des Serums erhöhte sich bei der Kuh, die täglich 200.000 IE Vitamin D_3 erhielt, nicht jedoch bei den mit Goldhafer gefütterten Tieren.

Die $1,25(OH)_2$-Vitamin D_3-Serumwerte der mit Vitamin D_3-Zulage gefütterten Kuh entsprachen denjenigen der Kontrolltiere. Hingegen erhöhten sie sich bei den Tieren, die Goldhafer aufnahmen, nach 9 Tagen von Werten um 60 pg/ml auf etwa 146 pg/ml. Innerhalb von 4 Tagen danach erfolgte ein Abfall, der zeitlich mit einer starken Abnahme des Goldhaferverzehrs zusammenfiel und möglicherweise dadurch bedingt war.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß in Goldhafer neben Vitamin D ein in 1α-Stellung hydroxyliertes Vitamin-D-Derivat vorliegt.

6. SUMMARY

The Influence of Trisetum flavescens Feeding on the Vitamin D Content of Cows' Milk

In the alpine regions of Germany and Austria enzootic calcinosis occurs due to the ingestion of the calcinogenic plant Trisetum flavescens. Because of the presence of vitamin D_3 in this plant, cattle feeding on grass or hay containing Trisetum flavescens consume elevated amounts of Vitamin D_3. In addition to vitamin D_3, Trisetum flavescens contains a still unknown vitamin D_3-metabolite-like component.

Investigations were carried out to determine if an elevation of vitamin D_3 occurs in milk of cows fed Trisetum flavescens. At the same time, serum concentrations of 25-OH-D and $1,25(OH)_2D_3$ were measured in order to further investigate the nature of the metabolite-like component.
In the first experiment, two cows received a diet of Trisetum flavescens for three weeks while two control cows were fed a ration of grass containing no Trisetum flavescens. The second experiment was conducted in the same way; additionally a further cow was fed 200.000 IE vitamin D_3 per day.

Analysis of vitamin D_3 in milk was carried out according to THOMPSON et al. (1977). The main steps of this procedure are saponification, extraction with diethylether, low pressure liquid chromatography on a Lipidex 5000 column, and high pressure liquid chromatography. 25-OH-D_3 and $1,25(OH)_2D_3$ were determined by competitive protein-binding

assay (MALLON et al. 1980).

The vitamin D content of milk of cows fed Trisetum flavescens did not exceed a concentration of 80 IE/l, which represented the detection limit of the method employed.

The serum concentration of 25-OH-vitamin D_3 was elevated in the animal receiving 200.000 IE vitamin D_3 per day, whereas cows feeding on Trisetum flavescens did not exhibit increased levels.

Serum concentrations of $1,25(OH)_2D_3$ of the cow on 200.000 IE D_3 per day were comparable to those of the negative controls. In Trisetum flavescens fed animals, concentrations of about 60 pg/ml increased to a mean value of 146 pg/ml on the 10th day of the diet. During the following 4 days levels again decreased. This coincided with a considerable decline in Trisetum flavescens consumption, which may be the cause for the drop of serum $1,25(OH)_2D_3$ levels.

These results indicate that, besides vitamin D_3, Trisetum flavescens apparently contains a 1α-hydroxylated metabolite.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Adachi, A., Kobayashi, T. (1979)
Identification of vitamin D_3 and 7-dehydrocholesterol in cows' milk by gas chromatography and mass spectrometry
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 25, 67-78

Ammon, R., Dirscherl, W.
in: Fermente, Hormone, Vitamine
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, S. 247-250

Bell, J.G., Christie, A.A. (1974)
Gas liquid chromatographic determination of vitamin D_2 in fortified full-cream dried milk
The Analyst 99, 1180, 385-396

Birckbeck, J.A., Scott, H.F. (1980)
25-OH-Vitamin D_3 serum levels in breast-fed infants
Arch. Dis. Child 55, 691-695

Bouillon, R., Van Baelen, H., Rambauts, W.,
De Moor, P. (1978)
Isolation and characterization of the vitamin D-binding protein from rat serum
J. Biol. Chem. 253, 4426-4431

Cockburn, F., Belton, N.R., Purvis, L.J.,
Giles, M.M., Brown, J.K. (1980)
Maternal vitamin D intake and mineral metabolism in mothers and their newborn infants
Brit. Med. J. 281, 11-14

DeLuca, H.F. (1981)
Recent advances in the metabolism of vitamin D
Ann. Rev. Physiology 43, 199-209

Dirksen, G., Plank, P., Hänichen, T., Spieß, A. (1972)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.
V. Experimentelle Untersuchungen bei Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knaulgras (Dactylis glomerata), Goldhafer (Trisetum flavescens) und einem Gräsergemisch
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 77-79

Dirksen, G. Wolf, M., Gebert, U., Kaemmerer, F. J. (1981)
Trisetum flavescens: Hinweis auf eine wasserlösliche Wirksubstanz
Zbl. Vet. Med. A28, 429-435

Döbereiner, J., Weiser, M.W., Isselbacher, K.J. (1977)
Experimental Solanum malacoxylon poisoning in calves
Brit. Vet. J. 131, 175-185

Dueland, S., Pedersen, J.I., Helgerud, P., Drevon, Ch.A. (1982)
Transport of vitamin D_3 from rat intestine
J. Biol. Chem. 257, 1, 146-150

Eisses, J., de Vries, R. (1969)
A chemical method for the determination of vitamin D in evaporated milk with elimination of cholesterol by digitonin precipitation
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52, 6, 1189-1195

Ege, R. (1970)
Der Vitamin D-Gehalt der Nahrung der dänischen Bevölkerung, analysiert auf Grund von Ernährungserhebungen. In: Vitamine 2, Hoffmann-La Roche u. Co AG, Basel, S. 93-100

Haddad, J.G., Hillman, L., Rojanasthit, S. (1976)
Human serum binding capacity and affinity for 25-hydroxyergocalciferol and 25-hydroxycholecalciferol
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 86-95

Henderson, S., Wickroski, A. (1978)
Reverse phase high pressure liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 5, 1130-1134

Hollis, B.W., Hibbs. J.W., Conrad, H.R. (1977)
Vitamin D binding factors in bovine blood
J. Dairy Sci. 60, 1605-1611

Hollis, B.W., Draper, H.H. (1979)
A comparative study of vitamin D binding globulins in milk
Comp. Biochem. Phys. 64B, 41-46

Hollis, B.W., Roos, B.A., Draper, H.H., Lambert, P.W. (1981)
Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk
J. Nutr. 111, 1240-1258

Hollis, B.W., Roos, B.A., Draper, H.H., Lambert, P.W. (1981)
On the occurrence of vitamin D-sulfate in human milk whey
J. Nutr. 111, 384-390

Hollis, B.W., Roos, B.A., Lambert, P.W. (1982)
Vitamin D compounds in human and bovine milk in: Advances in nutritional research, Vol. 4, Ed. H. Draper, Plenum Press, Guelph, p. 59-75

Holmberg, J., Larsson, G. (1980)
Seasonal variation of vitamin D_3 and 25-OH-D_3 in human serum
Clinica Chimica Acta 100, 173-174

Jones, S.W., Wilkie, R.A., Libby, M.W. (1965)
Modification of the USP chemical method for determining vitamin D in evaporated milk
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 48, 6, 1212-1217

Karg, H. (1953)
Untersuchungen über den Vitamin D-Gehalt der Milch unter besonderer Berücksichtigung seiner analytischen Feststellung
Diss. med. vet., München

Krook, L., Wasserman, K., McEntree, T.D., Brokken, M.B., Teigland, T. (1975)
Cestrum diurnum poisoning in Florida cattle
Cornell Vet. 65, 26-56

Lakdawala, D. Widdowson, E. (1977)
Vitamin D in human milk
The Lancet, Jan. 22, 167-168

Le Boulch, N., Gulat-Marnay, C., Raoul, Y. (1974)
Dérives de la vitamin D_3 des laits de femme et de vache: ester sulfate de cholecalciferol et hydroxy-25-cholecalciferol
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 44, 168-179

Le Boulch, N., Cancela, L., Miravet, L. (1982)
Cholecalciferol sulfate identification in human milk by HPLC
Steroids 39, 4, 391-398

Leerbeck, E., Sondergaard, H. (1980)
The total content of vitamin D in human milk and cows' milk
Br. J. Nutr. 44, 7-12

Lenkeit, W., Brune, H., Günther, K. (1958,1959,1960)
Ein Beitrag zur Vitamin D_2 - D_3 - Ausscheidung mit der Milch
Z. f. Tierern. u. Futtermittelkunde
1. Mitteilung 1958, 13, 247-254
2. " 1959, 14, 185-189
3. " 1960, 15, 155-158

MacLennon, W.J., Hamilton, J. (1980)
The effects of season and stage of pregnancy on plasma 25-OH-vitamin D_3 concentrations in pregnant women
Postgraduate Med. J. 56, 75- 9

Mallon, J.P., Hamilton, J.G., Nauss-Karol, C., Karol, K., Ashley, C.J., Matuszewski, D.S., Tratnyek, C.A., Bryn, G.F., Miller, O.N. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 201, 1, 277-285

Morris, K.M.L., Levack, V.M. (1982)
Evidence for aqueous soluble vitamin D-like substances in the calcinogenic plant Trisetum flavescens
Life Sciences 33, 1255-1262

Muniz, J.F., Wehr, C.T., Wehr, H.M. (1982)
Reverse phase liquid chromatographic determination of vitamin D_2 and D_3 in milk
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65, 4, 791-797

Norman, A.W. (1979)
in: Vitamin D: the calcium homeostatic steroid hormone
Academic Press, New York, San Francisco, London 1979, S. 70-90

Norman, A.W., Roth, J., Orci, L. (1982)
The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response (calcium binding proteins)
Endocrine Reviews, 331-366

Olson, W.G., Stevens, J.B., Horst, R.L. (1983)
Chronic vitamin D_3 toxicity in dairy cows.
Abstract. Fifth international conference on production disease in farm animals, Uppsala, Sweden

Panalaks, T. (1970)
A gas chromatographic method for the determination of vitamin D in fortified non-fat dried milk
The Analyst 95, 862-867

Panalaks, T. (1971)
Colorimetric method for the determination of vitamin D in fortified whole and partially skim fluid milks
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54, 6, 1299-1303

Peterlik, M., Regal, D.S., Köhler, H. (1977)
Eine 1,25$(OH)_2$-Vitamin D-artige Substanz als Ursache der kalzinogenen Wirkung des Goldhafers
Dtsch. tierärztl. Wschr. 84, 7, 253-255

Rambeck, W.A., Wetzel, A., Stark, H. (1979)
Distribution and activity of a vitamin D_3 compound in Trisetum flavescens
Abstract. Fourth workshop on vitamin D, Berlin,p.6

Rambeck, W.A. Oesterhelt, W., Vecchi, M., Zucker, H. (1979)
Occurrence of cholecalciferol in the calcinogenic plant Trisetum flavescens
Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 743-749

Rambeck, W.A., Elmer, D., Dirksen, G., Kräusslich, H., Zucker, H. (1980)
Vitamin D_3 levels in milk from sheep fed Trisetum flavescens
Proc. IVth conference of production disease in farm animals, Munich

Rambeck, W.A., Kreutzberg, O., Bruns-Droste, Ch., Zucker, H. (1981)
Vitamin D_3 in the grass Trisetum flavescens
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 104, 9-16

Rambeck, W.A., Ströhle, H.G., Wetzel, A., Zucker, H. (1981)
Calcinogenic activity of vitamin D_3 and vitamin D_3 palmitate in rat and rabbit
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51, 359-364

Rambeck, W.A., Zucker, H. (1982)
Vitamin D-artige Aktivitäten in calcinogenen Pflanzen
Zbl. Vet. Med. A, 289-296

Rambeck, W.A., Kreutzberg, O., Zucker, H. (1982)
Ruminal fluid increases the vitamin D activity of Trisetum flavescens. In: Vitamin D; chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism
W. de Gruyter u. Co. Berlin, New York, 329-331

Reeve, L., DeLuca, H.F. (1981)
Synthesis and biological activity of vitamin D_3 sulfate
J. Biol. Chem. 256, 2, 823-826

Reeve, L., Jorgensen, R., DeLuca, H.F. (1982)
Vitamin D compounds in cows' milk
J. Nutr. 112, 667-672

Reinhardt, T.A., Conrad, R. (1980)
A specific binding protein for $1,25(OH)_2D_3$ in bovine mammary gland
Arch. Biochem. Biophys. 203, 1, 108-116

Sahashi, Y., Suzuki, T. (1967)
Metabolism of vitamin D in animals. V. Isolation of vitamin D sulfate from mammalian milk
J. Vitam. 13, 33-36

Sahashi, Y., Suzuki, T. (1969)
Antirachitic potency of vitamin D sulfate in human milk
J. Vitam. 15, 78-82

Salvolainen, K. (1980)
A seasonal difference in serum 25-OH-vitamin D_3 in a Finnish population
Med. Biol. 58, 49-52

Thompson, J.N., Maxwell, W.B., L'Abbé, M. (1977)
High pressure liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 998-1002

Thompson, J.N., Hatina, G., Maxwell, W.B., Duval, S. (1982)
High pressure liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milks, margarine and infant formula
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65, 3, 624-631

Wasserman, R.H. (1978)
The nature and mechanism of action of the calcinogenic principle of Solanum malacoxylon and Cestrum diurnum and a comment on Trisetum flavescens.
in: R.F. Keeler: Effects of poisonous plants on livestock
Academic Press New York, 545-553

Worker, N.A., Carillo, B.J. (1967)
"Enteque seco", calcification and wasting in grazing animals in Argentine
Nature 215, 72-74

Zucker, H., Stark, H., Rambeck, W.A. (1980)
Light-dependent synthesis of cholecalciferol in a green plant
Nature 283, Nr. 5742, 68-69

Zucker, H., Rambeck, W.A. (1981)
Vitamin D_3 und Vitamin D_3-metabolitartige Aktivität in Trisetum flavescens
Zbl. Vet. Med. A 28, 436-441

Herrn Prof. Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Bei Herrn Dr. W. A. Rambeck möchte ich mich besonders für die jederzeit gewährte Hilfe und viele wertvolle Hinweise bedanken.

Ebenso danke ich Frau O. Kreutzberg, Frau A. Wetzel und Frau A. Bachhuber für die Unterstützung bei der Durchführung der Analysen.

Herrn Prof. Dr. G. Dirksen sei dafür gedankt, daß ich Ergebnisse der an der II. Medizinischen Tierklinik der Universität München durchgeführten Serumanalysen zur Abrundung meiner Arbeit verwenden durfte.

Auch gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. J. Meyer des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung der Universität München, der die Angaben über die Futteraufnahme der Tiere zur Verfügung stellte und Frau U. Hennes, Basel, für die Durchführung der Serumanalysen.

Lebenslauf

Am 8. Mai 1957 wurde ich als Tochter von Heinrich und Waldtraut Schmetz, geb. Pries, in Hiltrup/Westfalen geboren. Ab 1964 besuchte ich die Volksschule in Friesdorf bei Bonn, von 1965 bis 1968 die Black Lane Elementary School in Fairborn, Ohio, U.S.A. Ab 1968 war ich Schülerin im Otto-von-Taube-Gymnasium in Gauting bei München, wo ich 1977 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1977 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich im Mai 1983 mit dem Staatsexamen abschloß. Seither war ich als Doktorand am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München tätig. Seit 1982 bin ich mit dem Arzt Dr. Eberhard Fischer-Brandies verheiratet.